

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 10 月 25 日 (25.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/79494 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12,
C07K 16/18, C12P 21/08, C12N 1/15, 1/19, 1/21, 5/00,
A61K 39/395, A61P 35/00, 29/00, 7/00

菊地康文 (KIKUCHI, Yasufumi) [JP/JP]. 大友俊彦
(OHTOMO, Toshihiko) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県
御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
Shizuoka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03288

(22) 国際出願日: 2001 年 4 月 17 日 (17.04.2001)

(74) 代理人: 高木千嘉, 外(TAKAGI, Chiyoshi et al.); 〒
102-0083 東京都千代田区麹町一丁目10番地 麹町広
洋ビル Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-115246 2000 年 4 月 17 日 (17.04.2000) JP
特願 2000-321821
2000 年 10 月 20 日 (20.10.2000) JP
特願 2000-321822
2000 年 10 月 20 日 (20.10.2000) JP
PCT/JP01/01912 2001 年 3 月 12 日 (12.03.2001) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI
KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目
5番1号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

添付公開書類:

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福島
直 (FUKUSHIMA, Naoshi) [JP/JP]. 土屋政幸
(TSUCHIYA, Masayuki) [JP/JP]. 大枝匡義 (OHEDA,
Masayoshi) [JP/JP]. 宇野慎介 (UNO, Shinsuke) [JP/JP].

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: AGONIST ANTIBODIES

(54) 発明の名称: アゴニスト抗体

(57) Abstract: Modified antibodies containing 2 or more H chain V domains and 2 or more L chain V domains of a monoclonal antibody which can transmit a signal into cells by crosslinking a cell surface molecule, thereby serving as an agonist. Because of being usable as agonists for signal transmission, these modified antibodies are useful as, for example, preventives and/or remedies for various diseases such as cancer, inflammation, hormone disorders and blood diseases.

(57) 要約:

本発明は、細胞表面分子を架橋することにより細胞内にシグナル伝達してアゴニストとして作用しうる、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体に関する。この改変抗体は、シグナル伝達のアゴニストとして使用することができ、癌、炎症、ホルモン異常、血液疾患等の種々の疾患の予防及び/又は治療薬等として有用である。

明 細 書
アゴニスト抗体

技術分野

- 5 本発明は、細胞表面分子を架橋することによりアゴニスト作用を示す、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む改変抗体に関する。当該改変抗体は、細胞表面分子を架橋することにより細胞内にシグナルを伝達しうるアゴニスト作用を有しており、種々の医薬として有用である。

10 背景技術

- 特開平9-295999号公報は、脾臓間質細胞を識別し得る特定の抗体を開発することを目標として当該脾臓間質細胞株を感作抗原とするモノクローナル抗体の作製を試み、抗原としてマウス Integrin Associated Protein (マウス I A P) を認識する新規モノクローナル抗体の取得を記載している。また、特開平9-295999号公報は、モノクローナル抗体が骨髓系細胞にアポトーシスを誘起する特性を有することを開示している。

- WO 99/12973は、ヒトの Integrin Associated Protein (以下ヒト I A Pとする; J. Cell Biol., 123, 485-496, 1993 にアミノ酸配列及び塩基配列が記載; Journal of Cell Science, 108, 3419-3425, 1995) を抗原とするモノクローナル抗体であって、当該ヒト I A P を有する有核血液細胞(骨髓系細胞及びリンパ球) にアポトーシスを誘起させる特性を有するモノクローナルMABL-1抗体、MABL-2抗体、これを産生するハイブリドーマ、MABL-1 (FERM BP-6100) 及びMABL-2 (FERM BP-6101) を記載している。

- 25 特願平11-63557号は、ヒト I A P を抗原とするモノクローナル抗体から、ヒト I A P を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起する特性を有する一本鎖のFv領域を有する一本鎖Fvを得たことを開示している。

しかし、I A P を抗原とするモノクローナル抗体の投与は、I A P を有する有

誘導されたことを突き止めた。即ち、これは、単一特異性の一本鎖F_vダイマーが細胞表面上の分子（例えば受容体）を架橋することにより、リガンドと同様にシグナルを伝達し、これによりアゴニスト作用を示し得ること示唆するものである。

- 5 次に細胞間の架橋形成に注目したところ、前記モノクローナル抗体は赤血球凝集を引き起こすが、前記一本鎖F_vのダイマーは赤血球凝集を起こさないことを見出した。同様の結果は、一本鎖2価抗体（2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む一本鎖ポリペプチド）でも観察された。即ち、これはモノクローナル抗体では細胞間で架橋が形成される可能性があるのに対して、一本鎖F_vダイマー
10 一または一本鎖2価抗体等の改変抗体では、細胞表面上の分子を架橋するが、細胞間の架橋を形成しないことを示唆するものである。

故に、本発明者は、抗体分子（whole IgG）を一本鎖F_vダイマーまたは一本鎖2価抗体などの改変抗体にすることにより、細胞間の架橋などによる副作用を軽減し、且つ細胞表面上の分子を架橋して、細胞に所望の作用のみを誘起しうる新規な医薬品を提供しうることを見出し、本発明を完成させた。また、
15 本発明の改変抗体は元のモノクローナル抗体と比較して顕著に高い活性を有しており、さらに抗体分子に比べ分子量が小さく、定常領域を有しないという特徴から、組織移行性が向上しているという特徴を有している。

20 発明の開示

本発明の課題は、本発明は、細胞表面分子と結合することにより細胞内にシグナルを伝達してアゴニストとして作用しうる、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む低分子化アゴニスト改変抗体を提供することである。

- 25 従って、本発明は、細胞表面分子を架橋することによりアゴニスト作用を示す、モノクローナル抗体のH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上、好ましくは各々2～4、特に好ましくは各々2つ含む改変抗体に関する。

本発明の改変抗体は、好ましくは1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含

でき、副作用の抑制や、所望の時期に所望の時間薬剤の効力を発揮せうる薬剤投与システムとして有用である。

本発明の改変抗体はまた、モノクローナル抗体（例えば、MAB L-1 抗体、MAB L-2 抗体など）のL鎖V領域及びH鎖V領域を含み、細胞表面分子、例えば蛋白質（受容体またはシグナル伝達に関与する蛋白質）、または前記蛋白質もしくは細胞膜タンパク質の糖鎖を特異的に認識して当該表面分子を架橋し、これにより細胞内にシグナルを伝達しうるものであればいかなるものでもよく、さらには、このV領域のアミノ酸配列の一部を改変した改変抗体も包含される

本発明はまた、前記改変抗体のヒト型化に関するものであり、ヒト型化改変抗体はヒト型化H鎖V領域及び／又はヒト型化L鎖V領域を含む。詳細には、ヒト型化改変抗体は、ヒトモノクローナル抗体L鎖V領域のフレームワーク領域（FR）とマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域のCDRを含むヒト型化L鎖V領域及び／又はヒトモノクローナル抗体H鎖V領域のFRとマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域のCDRを含むヒト型化H鎖V領域から構成される。この場合、CDRおよびFRのアミノ酸配列を一部改変（例えば、欠失、置換又は付加）してもよい。

さらに本発明は、ヒトモノクローナル抗体L鎖C領域とマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域及び／又はヒトモノクローナル抗体H鎖C領域とマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域を含んで成る、ポリペプチドをも包含する。

本発明はまた、上記マウスCDRに相当する、マウス以外の哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、ウシ、ヒツジ、サルなど）のモノクローナル抗体由来のCDR、又は当該CDRを含有するH鎖V領域及びL鎖V領域を含んで成る、細胞表面分子と結合することにより細胞内にシグナル伝達してアゴニストとして作用しうる改変抗体に関する。そのようなCDR、H鎖V領域及びL鎖V領域には、例えばトランスジェニックマウス等から作製されたヒトモノクローナル抗体由来のCDR、該CDRを含有するヒトモノクローナル抗体由来のH鎖V領域及びL鎖V領域も包含される。

本発明はまた、前記種々の改変抗体をコードするDNA、該DNAを含んで成

インターロイキン-11 (IL-11) 受容体、インターロイキン-12 (IL-12) 受容体、インターロイキン-13 (IL-13) 受容体、インターロイキン-15 (IL-15) 受容体、インターフェロン- α (IFN- α) 受容体、インターフェロン- β (IFN- β) 受容体、インターフェロン- γ (IFN- γ) 受容体、成長ホルモン (GH) 受容体、インスリン受容体、血液幹細胞増殖因子 (SCF) 受容体、血管上皮増殖因子 (VEGF) 受容体、上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体、神経成長因子 (NGF) 受容体、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 受容体、血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) 受容体、白血球遊走阻止因子 (LIF) 受容体、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体、オノスタチンM (OSM) 受容体およびNotchファミリー受容体等を挙げることができる。故に、当該アゴニスト改変抗体を有効成分として含有する医薬製剤は、癌、炎症、ホルモン異常および血液疾患などの治療及び／又は予防に有用である。

本発明の改変抗体は、モノクローナル抗体に由来するH鎖V領域を2つ以上及びL鎖V領域を2つ以上含む。当該改変抗体の構成としては、好ましくは1つのH鎖V領域及び1つのL鎖V領域を含む一本鎖Fvのダイマー又は2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含むポリペプチドとすることができる。該改変抗体中において、H鎖およびL鎖のV領域は、1個以上のアミノ酸からなるペプチドリッカーを介して連結されているのが好ましい。これらの改変抗体は、モノクローナル抗体の可変領域を含有し、且つ相補性決定領域 (complementarity determining region; 以下CDRとする) を保存し、もとのモノクローナル抗体と同一の特異性をもって抗原に結合する。

H鎖V領域

本発明において、モノクローナル抗体に由来するH鎖V領域には、細胞表面分子、例えば蛋白質 (受容体またはシグナル伝達に関与する蛋白質)、または前記蛋白質もしくは細胞膜上の糖鎖を認識し、且つ前記分子を架橋してオリゴマー化、例えば2量体化することにより、細胞内にシグナルを伝達しうる細胞内にシグナルを伝達してアゴニストとして作用しうるモノクローナル抗体中のH鎖V領域で

その結果 3 個の CDR はループを形成し、CDR は場合により β -シート構造の一部を形成することもある。3 個の CDR は FR によって相互に立体的に非常に近い位置に保持され、そして対をなす領域の 3 個の CDR と共に抗原結合部位の形成に寄与する。

- 5 これらの CDR 領域は、得られた抗体の V 領域のアミノ酸配列と既知抗体の V 領域の既知アミノ酸配列とを照合することによって、Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」の経験則から見出すことができる。

一本鎖 F_v

- 10 一本鎖 F_v は、モノクローナル抗体に由来する、連結した H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域を含むポリペプチドのモノマーであり、得られる一本鎖 F_v はもとのモノクローナル抗体の変換領域を含有し、相補性決定領域を保存するため、もとのモノクローナル抗体と同一の特異性をもって抗原に結合する（特願平 11-63557 号）。さらに、本発明の一本鎖 F_v において、前記可変領域および／または C
- 15 DR の一部またはそのアミノ酸配列の一部を改変（例えば、欠失、置換又は付加）することができる。本発明の一本鎖 F_v を構成する H 鎖 V 領域及び L 鎖 V 領域は上述したものであり、H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域を直接又はリンカー、好ましくはペプチドリナーを介して連結することができ、その構成としては、[H 鎖 V 領域] - [L 鎖 V 領域]、[L 鎖 V 領域] - [H 鎖 V 領域] のいずれでもよい。本
- 20 発明においては、これら一本鎖 F_v はダイマー、トリマー又はテトラマーを形成させ、本発明の改変抗体とすることができる。

一本鎖改変抗体

- 本発明の 2 つ以上の H 鎖 V 領域及び 2 つ以上の L 鎖 V 領域、好ましくは各々 2 ~ 4、特に好ましくは各々 2 つ含む一本鎖改変抗体は、上述のような 2 つ以上の
- 25 H 鎖 V 領域と L 鎖 V 領域をそれぞれ含有する。このポリペプチドにおいて各領域は、該一本鎖改変抗体が特定の立体構造、具体的には一本鎖 F_v のダイマーが構成する立体構造を模倣し得るよう配置させる必要があり、例えば

[H 鎖 V 領域] - [L 鎖 V 領域] - [H 鎖 V 領域] - [L 鎖 V 領域]

連結するためのペプチドリッカーの長さは1～30アミノ酸、好ましくは1～20アミノ酸、さらに好ましくは3～18アミノ酸である。また、[H鎖V領域]－[L鎖V領域]（又は[L鎖V領域]－[H鎖V領域]）からなる同一の抗原結合部位を形成しないもの同士を連結するためのペプチドリッカーの長さは1～40アミノ酸、好ましくは3～30アミノ酸、さらに好ましくは5～20アミノ酸である。これらのリンカーを導入する方法は本発明の改変抗体をコードするDNAの構築方法の説明において述べる。

本発明における合成化学物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN－ヒドロキシスクシンイミド（NHS）ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS³）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ－EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ－DST）、ビス〔2－（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル〕スルホン（BSOCOES）、ビス〔2－（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル〕スルホン（スルホ－BSOCOES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

特に、一本鎖F_vのダイマーを形成させる場合、宿主細胞で産生された一本鎖モノマーを培地等の溶液中で、20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上ダイマー化するのに適したリンカーを選択することが好ましく、具体的には2～12アミノ酸、より好ましくは3～10アミノ酸、またはこれに相当する他のリンカーが好ましい。

25 改変抗体の製造

改変抗体は、細胞表面分子に特異的に結合する既知または新規なモノクローナル抗体由来のH鎖V領域とL鎖V領域とを前述のリンカーを介して連結することにより得られる。一本鎖F_vの例として、MABL－1抗体、MABL－2抗体

MABL-2抗体のH鎖V領域及びL鎖V領域をコードするDNAをポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いて増幅するには、Jones, S. T. ら、Bio/Technology, 9, 88-89, 1991 に記載されているプライマーを用いることができる。

5 次に、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法を用いてMABL-1抗体及びMABL-2抗体のL鎖V領域を増幅するため、5'-末端オリゴヌクレオチドプライマー及び3'-末端オリゴヌクレオチドプライマーを上述のように決定する。同様にして、MABL-1抗体のH鎖V領域及びMABL-2抗体のH鎖V領域の増幅のため、それぞれ5'-末端プライマー及び3'-末端プライマーを決定する。

10 その例として本発明においては、5'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素HinfI切断部位を提供する配列GANTCを含有し、そして3'-末端プライマーはその5'-末端近傍に制限酵素XmaI切断部位を提供するヌクレオチド配列CCCGGGを含有するものを使用している。これらの制限酵素切断部位は可変領域をコードする目的のDNA断片をクローニングベクターにサブクローニングするために用いられる限り、他の制限酵素切断部位でもよい。

特に設計されたPCRプライマーを用いて、MABL-1、MABL-2抗体の各V領域をコードするcDNAをそれらの5'-及び3'-末端において適当な塩基配列を導入して、それらが発現ベクターに容易に挿入されるように、且つそれらが該発現ベクター中で適切に機能するようにした（例えば、本発明ではKozak配列の導入により転写効率を上げるように工夫されている）。次に、これらのプライマーを用いてPCRにより増幅して得たMABL-1、MABL-2抗体の各V領域を、所望のヒトC領域をすでに含有するHEF発現ベクター（WO 92-19759参照）に挿入した。クローン化されたDNAの配列決定は任意の常法、例えば、適当なベクターに挿入し、自動DNAシーケンサー（Applied Biosystems 社製）を用いて行うことができる。

25 本発明の改変抗体において、リンカー、例えばペプチドリンカーは次のように導入することができる。即ち、上述のH鎖V領域及びL鎖V領域のためのプライマーと一部相補的な配列を有し、且つ該リンカーのN-末端またはC-末端をコ

の蛋白質で用いられる分離・精製方法、例えば各種クロマトグラフィー、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組合せて、本発明の改変抗体を分離・精製することができるが、これらに限定されるものではない。

再構成一本鎖F_vを動物細胞、例えば、COS 7細胞、CHO細胞などの動物
5 培養細胞、好ましくはCHO細胞で産生する場合、無血清培地で該再構成一本鎖F_vを産生させると、培地中で効率よく該一本鎖F_vのダイマーを形成することができる。さらに、該ダイマーを精製する際には、形成されたダイマーを安定的に高収率で回収することができると共に長期間、ダイマーの状態で保存することができる。この場合に用いることができる無血清培地は、通常組み換えタンパク
10 質の産生に用いられている培地であればいかなるものでもよく、特に限定されるものではない。

本発明の改変抗体の製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば大腸菌細胞等を使用することができる。好ま
15 しくは、本発明の改変抗体は哺乳類細胞、例えばCOS 7細胞又はCHO細胞中で発現される。

ヒトIAPを有する細胞に結合する本発明の再構成ポリペプチドの製造のために任意の発現系、例えば真核細胞、例えば動物細胞、例えば樹立された哺乳類細胞系、真糸状菌細胞、及び酵母細胞、並びに原核細胞、例えば細菌細胞、例えば
20 大腸菌細胞等を使用することができる。好ましくは、本発明の再構成ポリペプチドは哺乳類細胞、例えばCOS 7細胞又はCHO細胞中で発現される。

これらの場合、哺乳類細胞での発現のために有用な常用のプロモーターを用いることができる。例えば、ヒト・サイトメガロウイルス (Human cytomegalovirus : HCMV) 前期 (immediate early) プロモーターを使用するのが好まし
25 い。HCMVプロモーターを含有する発現ベクターの例には、HCMV-VH-HC_γ1、HCMV-VL-HCK等であって、PSV2neoに由来するプラスミドベクター (国際公開公報WO 92/19759参照) が包含される。

また、その他に、本発明のために用いることのできる哺乳動物細胞における遺

達による変化（例えば、ヒト I A P 抗原特異的に細胞死を誘導するか否か）を評価する。

in vivo での評価試験は、例えば改変抗体がヒト I A P を認識する場合（例えば M A B L - 1 抗体、M A B L - 2 抗体由来の改変抗体）、アポトーシス誘起効果として、次の通りに行う。まずヒト骨髓腫のモデルマウスを作成し、当該マウスに I A P を有する有核血液細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体、本発明の改変抗体を静脈投与する。対照群には P B S のみを投与する。そして、アポトーシス誘起を、抗腫瘍効果としてマウス血清中のヒト I g G の量の変化及び生存期間によって評価する。

本発明の改変抗体は、2 つ以上の H 鎖 V 領域及び 2 つ以上の L 鎖 V 領域、好ましくは各々 2 ～ 4、特に好ましくは各々 2 つ含むものであり、1 つの H 鎖 V 領域及び 1 つの L 鎖 V 領域を含む一本鎖 F_v のダイマー、又は 2 つ以上の H 鎖 V 領域及び 2 つ以上の L 鎖 V 領域を連結した一本鎖ポリペプチドである。このような構成をとることで、もとのモノクローナル抗体の抗原結合部位の立体構造を模倣して、優れた抗原結合性を保持するものと考えられる。

本発明の改変抗体は、抗体分子（w h o l e I g G）と比較して顕著な低分子化が達成させているため、組織、腫瘍への移行性に優れており、さらにもとのアゴニスト抗体分子よりも高い活性を有する。このため、本発明の改変抗体の元となるモノクローナル抗体を適宜選択することによって、種々のシグナルを細胞内に伝達することができる。故に、これを含有する医薬製剤は、シグナル伝達の誘起が疾病の治療に有効である、例えば癌、炎症、ホルモン異常、並びに白血病、悪性リンパ腫、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群および真性多血症などの血液疾患の治療薬としての利用が期待される。また、R I 標識による造影剤としての利用も期待され、R I 化合物やトキシン等の他の化合物と結合させることにより、効力を増強させることも可能である。

次に本発明を、ヒト I A P に結合するモノクローナル抗体（M A B L - 1 抗体、M A B L - 2 抗体）由来の改変抗体を例にして、下記の実施例により具体的に説明するが、これにより本発明の範囲が限定されるものではない。

0.16 mM dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、2.5 ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製)、0.2 μ Mの配列番号：1に示すアダプタープライマーと0.2 μ Mの配列番号：2に示すMKCプライマー及びMABL-1由来の二本鎖cDNA 0.1 μ gを含有し、
5 94℃の初期温度にて9分間そして次に94℃にて1分間、60℃にて1分間及び72℃にて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72℃で10分間加熱した。

(2) MABL-1 H鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、
10 及び配列番号：3に示すMHC- γ 1 (Mouse Heavy Constant) プライマー (Bio/Technology, 9, 88-89, 1991) を用いた。

cDNAの増幅は、0.2 μ MのMKCプライマーの代わりに0.2 μ MのMHC- γ 1プライマーを用いて増幅した点を除いて、前記1.3 (1)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

(3) MABL-2 L鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、
及び配列番号：2に示すMKCプライマーを用いた。

cDNAの増幅は、MABL-1由来の二本鎖cDNA 0.1 μ gの代わりにMABL-2由来の二本鎖cDNA 0.1 μ gを用いて増幅した点を除いて、前
20 記1.3 (1)においてMABL-1 L鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

(4) MABL-2 H鎖V領域をコードするcDNAの増幅

PCRのためのプライマーとして配列番号：1に示すアダプタープライマー1、
及び配列番号：4に示すMHC- γ 2aプライマー (Bio/Technology, 9, 88-89,
25 1991) を用いた。

cDNAの増幅は、0.2 μ MのMKCプライマーの代わりに0.2 μ MのMHC- γ 2aプライマーを用いて増幅した点を除いて、前記1.3 (3)においてL鎖V領域遺伝子の増幅について記載したのと同じ方法により行った。

ードする遺伝子を含むするプラスミドを精製DNA断片から作製し、p G E M-M 2 Lと命名した。

また、ハイブリドーマM A B L-2に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むするプラスミドを精製DNA断片から作製し、p G E M-M 2 Hと命名した。

実施例2 (DNAの塩基配列の決定)

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列の決定は、自動DNAシーケンサー (Applied Biosystem 社製) 及び ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem 社製) を用いて、メーカー指定のプロトコールに従って行った。

プラスミドp G E M-M 1 Lに含まれるマウスM A B L-1抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 5に示す。

また、プラスミドp G E M-M 1 Hに含まれるマウスM A B L-1抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 6に示す。

また、プラスミドp G E M-M 2 Lに含まれるマウスM A B L-2抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 7に示す。

また、プラスミドp G E M-M 2 Hに含まれるマウスM A B L-2抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列を配列番号: 8に示す。

実施例3 (CDRの決定)

L鎖及びH鎖のV領域の全般的構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、即ち相補性決定領域 (CDR) により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的良く保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い (Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」US Dept. Health and Human Services, 1983)。

このような事実に基づき、ヒトI A Pに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をK a b a tらにより作製された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめ、相同性を調べることによりCDR領域を表1に示す如く

94℃の初期温度にて9分間そして次に94℃にて1分間、60℃にて1分間及び72℃にて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72℃で10分間加熱した。

PCR生成物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、Hind III 及びBamHIで消化し、そしてL鎖V領域については、HEF発現ベクターHEF- κ に、H鎖V領域についてはHEF発現ベクターHEF- γ にそれぞれクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-M1L、HEF-M1Hと命名した。

4. 2 キメラMABL-2抗体発現ベクターの作製

cDNAの修飾及びクローニングは、pGEM-M1L及びpGEM-M1Hの代わりにpGEM-M2L及びpGEM-M2Hを鋳型DNAに増幅した点を除いて、前記4. 1において記載したのと同じ方法により増幅及びクローニングを行い、DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをそれぞれHEF-M2L、HEF-M2Hと命名した。

4. 3 COS7細胞への遺伝子導入

キメラMABL-1抗体及びキメラMABL-2抗体の一過性発現を観察するため、前記発現ベクターをCOS7細胞において試験した。

(1) キメラMABL-1抗体の遺伝子導入

HEF-M1LとHEF-M1Hベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションによりCOS7細胞に同時形質転換した。各DNA (10 μ g) と、PBS中 1×10^7 細胞/mlの0.8mlをキューベツトに加え、1.5 kV、25 μ Fの容量にてパルスを与えた。

室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10%の γ -グロブリンフリーウシ胎児血清を含有するDMEM培養液 (GIBCO BRL 社製) に加えた。72時間培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

(2) キメラMABL-2抗体の遺伝子導入

は、H鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つNcoI制限酵素認識部位を有するように設計した。H鎖V領域のための後方プライマーVHAS（プライマーB、配列番号：14）は、H鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つリンカーとオーバーラップするように設計した。

- 5 リンカーのための前方プライマーLS（プライマーC、配列番号：15）は、リンカーのN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つH鎖V領域のC末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。リンカーのための後方プライマーLAS（プライマーD、配列番号：16）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。
- 10

- L鎖V領域のための前方プライマーVLS（プライマーE、配列番号：17）は、リンカーのC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つL鎖V領域のN末端をコードするDNAとオーバーラップするように設計した。L鎖V領域のための後方プライマーVLAS-FLAG（プライマーF、配列番号：18）は、
- 15 L鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つFLAGペプチドをコードする配列（Hopp, T. P. ら、Bio/Technology, 6, 1204-1210, 1988）、2個の転写停止コドン及びEcoRI制限酵素認識部位を有するように設計した。

- 第一PCR段階において3つの反応A-B、C-D及びE-Fを行い、そして各PCR生成物を精製した。第一PCRから得られた3つのPCR生成物をそれぞれ自体の相補性によりアッセンブルさせた。次に、プライマーA及びFを加えて、
- 20 再構成MABL-1抗体一本鎖Fvをコードする全長DNAを増幅した（第二PCR）。なお、第一PCRにおいては、再構成MABL-1抗体H鎖V領域をコードするプラスミドpGEM-M1H（実施例2を参照）、Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser（配列番号：19）からなるリンカー領域をコードするDNA配列（Huston, J. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5879-5883, 1988）を含んで成るプラスミドpSC-DP1、及び再構成MABL-1抗体L鎖V領域をコードするプラスミドpGEM-M1L（実施例2を参照）をそれぞれ
- 25

L-1 抗体一本鎖Fvの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：20に示す。

次に、哺乳動物細胞にて再構成MABL-1 抗体一本鎖Fvを発現するベクターを作製するため、pscm1ベクターをPCR法により修飾した。そして得られたDNA断片をpCHO1発現ベクターに導入した。なお、本発現ベクターp

5 CHO1は、DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (WO92/19759参照) から、EcoRI及びSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造社製) を連結することにより構築したベクターである。

PCRに使用するプライマーは、前方プライマーとしてH鎖V領域のN末端を

10 コードするDNAにハイブリダイズし且つSalI制限酵素認識部位を有する配列番号：21に示すSal-VHSプライマー及び後方プライマーとして第一フレームワーク配列の最後をコードするDNAにハイブリダイズする配列番号：22に示すFRH1antiプライマーを用いた。

PCR溶液100 μ lは、10 μ lの10 \times PCR Buffer II、2mM Mg

15 Cl₂、0.16mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold、0.4 μ Mずつの各プライマー、及び8ngの鋳型DNA (pscm1) を含有し、95 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に95 $^{\circ}$ Cにて1分間、60 $^{\circ}$ Cにて1分間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分20秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで7分間加熱した。

PCR生成物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、SalI及びMboIIで消化し、N末端側再構成MABL-1 抗体一本鎖FvをコードするDNA断片を得た。また、pscm1ベクターをMboII及びEcoRIで消化し、C末端側再構成MABL-1 抗体一本鎖FvをコードするDNA断片を得た。そして、SalI-MboII DNA断片及びMboII-EcoRI

25 DNA断片をpCHO1-Igsベクターにクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをpCHOM1と命名した (図6を参照)。なお、本発現ベクターpCHO1-Igsは、哺乳動物細胞分泌発現系に適するマウスIgG1シグナル配列 (Nature,

pCHOM2ベクターを遺伝子導入したCOS7細胞培養上清中における再構成MABL-2抗体一本鎖Fvをウェスタンブロッティング法により確認した。

pCHOM2ベクターを遺伝子導入したCOS7細胞培養上清及びコントロールとしてpCHO1ベクターを遺伝子導入したCOS7細胞培養上清についてSDS電気泳動を行い、REINFORCED NC膜 (Schleicher & Schuell 社製) に転写した。5%スキムミルク (森永乳業社製) にてブロッキングを行い、0.05%Tween 20-PBSにて洗浄後、抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。室温にてインキュベーション及び洗浄の後、アルカリフォスファターゼ結合抗マウスIgG抗体 (Zymed 社製) を加え、室温にてインキュベーション及び洗浄後、基質溶液 (Kirkegaard Perry Laboratories 社製) を添加し、発色させた (図7)。

その結果、pCHOM2ベクター導入COS7細胞培養上清中にのみFLAGペプチド特異的なタンパク質が検出され、この培養上清中に再構成MABL-2抗体一本鎖Fvが分泌されていることが明らかとなった。

5. 5 フローサイトメトリー

抗原への結合を測定するため、前記COS7細胞培養上清を用いてフローサイトメトリーを行った。ヒト Integrin Associated Protein (IAP) を発現するマウス白血病細胞株L1210細胞、あるいはコントロールとしてpCOS1ベクターを形質転換したL1210細胞 2×10^5 個に、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvを発現させたCOS7細胞の培養上清あるいはコントロールとしてpCHO1ベクターを形質転換したCOS7細胞の培養上清を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、マウス抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC標識した抗マウスIgG抗体 (BECTON DICKINSON 社製) を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、FACSscan装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

その結果、再構成MABL-2抗体一本鎖Fvは、ヒトIAPを発現するL1210細胞に特異的に結合したことにより、この再構成MABL-2抗体一本鎖Fvがヒト Integrin Associated Protein に対するアフィニティーを有すること

色を行い、FACS can 装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

Annexin-V 染色による解析の結果を図 13~18 にそれぞれ示した。ここで、図の左下の領域にあるドットは生細胞を、右下の領域はアポトーシス初期の細胞を、右上の領域はアポトーシス後期の細胞を示す。その結果、再構成 MABL-2 抗体一本鎖 Fv (MABL2-scFv) は L1210 細胞においてヒト IAP 抗原特異的に著しい細胞死を誘導した (図 13~16)。また、CCR F-CEM 細胞においてもコントロールに比較して著しい細胞死を誘導した (図 17~18)。

5. 8 CHO 細胞における MABL-2 抗体由来の一本鎖 Fv ポリペプチドの発現

MABL-2 抗体由来の一本鎖 Fv (ポリペプチド) の恒常的発現 CHO 細胞株を樹立するため、pCHOM2 ベクターを CHO 細胞に遺伝子導入した。

pCHOM2 ベクターを、Gene Pulser 装置 (BioRad 社製) を用いてエレクトロポレーションにより CHO 細胞に形質転換した。DNA (10 μ g) と PBS に懸濁した CHO 細胞 (1×10^7 細胞/ml) の 0.7 ml を混合したものをキュベットに加え、1.5 kV、25 μ F の容量にてパルスを与えた。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、10% のウシ胎児血清を含有する核酸不含 α -MEM 培地 (GIBCO BRL 社製) に加え培養した。得られたクローンについて、SDS-PAGE にて目的とするタンパク質の発現を確認し、発現量の高いクローンを MABL-2 抗体由来の一本鎖 Fv の産生細胞株として選択した。10 nM methotrexate (SIGMA 社製) を含む無血清培地 CHO-S-SFM II (GIBCO BRL 社製) にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して回収培養上清を得た。

5. 9 CHO 細胞産生の MABL-2 抗体由来の一本鎖 Fv の精製

5. 8 で得た一本鎖 Fv 発現 CHO 産生株の培養上清を人工透析用カートリッジ (PAN130SF、旭メディカル) を用いて約 20 倍まで濃縮した。濃縮液は -20℃ で保存し、精製時解凍して用いた。

図21に示すように、A I、B Iいずれも還元剤の添加の有無に関わらず、見かけ上の分子量約35 kDに単一バンドを与えた。以上の結果から、A Iは一本鎖F_vのモノマーで、B Iは一本鎖F_vの非共有結合性ダイマーと考えられる。画分A I及びB IをTSK gel G3000SWカラム(7.5×60mm)を用いたゲル濾過により分析した結果、画分A Iはモノマーのピークのみ、画分B Iはダイマーのピークのみ検出された(図22を参照)。また、ダイマー画分(画分B I)は、全一本鎖F_vの約4%であった。該ダイマー画分中のダイマーは、その90%以上が4℃で1ヶ月以上安定的に維持された。

5. 10 大腸菌細胞でのMABL-2抗体由来の一本鎖F_vポリペプチド発現ベクターの構築

MABL-2抗体由来の一本鎖F_vを大腸菌菌体内にて効率的に発現するベクターを作製するため、p s c M2ベクターをPCR法により修飾した。得られたDNA断片をp S C F V T 7発現ベクターに導入した。

PCRに使用するプライマーは、前方プライマーとしてH鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つ開始コドン及びN d e I制限酵素認識部位を有する配列番号: 27に示すN d e -V H S m 0 2プライマー及び後方プライマーとしてL鎖V領域のC末端をコードするDNAにハイブリダイズし且つ2個の停止コドン及びE c o R I制限酵素認識部位を有する配列番号: 28に示すV L A Sプライマーを用いた。なお、前方プライマーのN d e -V H S m 0 2は大腸菌菌体内にて効率的に発現するため、H鎖V領域のN末端をコードするDNAにハイブリダイズする部分に5カ所の点変異を含んでいる。

PCR溶液100 μlは、10 μlの10×PCR Buffer #1、1 mM M g C l₂、0.2 mM d N T P s、5ユニットのKOD DNAポリメラーゼ(以上東洋紡社製)、1 μMずつの各プライマー、及び100 ngの鋳型DNA(p s c M2)を含有し、98℃にて15秒間、65℃にて2秒間及び74℃にて30秒間、この順序で加熱した。この温度サイクルを25回反復した。

PCR生成物をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製)を用いて精製し、N d e I及びE c o R Iで消化し、得られたDNA断片をp S C F V T 7ベ

殿として回収し、上清にくる夾雑蛋白質を除去した。

目的蛋白質を含んだ封入体を6M Urea、5mM EDTA、0.1M NaClを含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、4M Urea、5mM EDTA、0.1M NaCl、10mM メルカプトエタノールを含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)で平衡化したSephacryl S-300(5×90cm、AMERSHAM PHARMACIA 社製)ゲル濾過カラムに、流速5ml/分で添加し、会合している高分子量の一本鎖Fvを除去した。各画分をSDS-PAGEで分析し、純度の高い画分について、 $OD_{280}=0.25$ になるようにゲル濾過で用いた溶媒で希釈後、5mM EDTA、0.1M NaCl、0.5M Arg、2mM 還元型グルタチオン、0.2mM 酸化型グルタチオンを含む50mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)に対して透析を3回行うことにより、巻き戻し操作を行った。さらに0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液(pH6.0)に対して3回透析し、溶媒交換を行った。

わずかに含まれる分子間でS-S結合で架橋された高分子を分離除去するため、0.15M NaClを含む20mM 酢酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したSuperdex 200pg(2.6×60cm、AMERSHAM PHARMACIA 社製)ゲル濾過カラムに添加した。図24に示すように、高分子量の会合体と考えられるブロードなピークのあと、主要ピークとサブピークの2つのピークが検出された。SDS-PAGEによる分析(図21参照)及びゲル濾過の溶出位置から、主要ピークは一本鎖Fvポリペプチドのモノマーであり、サブピークは非共有結合性のダイマーと考えられる。なお、形成された非共有結合性のダイマーは、全一本鎖Fvポリペプチドの約4%であった。

5. 13 MABL-2抗体由来の精製一本鎖Fvポリペプチドのin vitroでのアポトーシス誘起効果

ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞(hIAP/L1210)を用い、CHO細胞及び大腸菌細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチド(MABL2-scFv)のアポトーシス誘起作用を、次の2つのプロトコールにてAnnexin-V(BOEHRINGER MANNHEIM 社製)染色により検討した。

血清あるいは標品としてヒトIgG (Cappel 社製、Lot # 00915) 100 μ l を添加し、室温にて2時間インキュベーションした。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG抗体 (BIOSOURCE 社製、Lot # 6202) 100 μ l を加え、室温にて1時間インキュベーションした。洗浄後、基質溶液を加え、インキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (BioRad 社製) を用いて405nmの吸光度を測定し、標品のヒトIgGの吸光度より得られた検量線から、マウス血清中のヒトIgG (Mタンパク質) 濃度を算出した。

(2) 投与抗体の調製

s c F v / CHOポリペプチドのモノマー及びダイマーは、投与当日、濾過滅菌したPBS (一) を用いて、それぞれ0.4mg/ml、0.25mg/mlになるように調製し、投与試料とした。

(3) ヒト骨髓腫マウスモデルの作製

ヒト骨髓腫マウスモデルは以下のように作製した。SCIDマウス (日本クレア) を用いて in vivo 継代したKPMM2細胞 (特開平7-236475号公報) を10%ウシ胎児血清 (GIBCO BRL 社製) を含むRPMI 1640培地 (GIBCO BRL 社製) で 3×10^7 個/mlになるように調製した。あらかじめ前日抗シアロGM1抗体 (和光純薬社製、1バイアルを5mlで溶解) 100 μ l を皮下投与したSCIDマウス (オス、6週齢) (日本クレア) に上記KPMM2細胞懸濁液200 μ l (6×10^6 個/マウス) を尾静脈より注入した。

(4) 抗体投与

(3) で作製したヒト骨髓腫マウスモデルに対し、KPMM2細胞移植後3日目より、1日2回、3日間、上記(2) で調製した投与試料、モノマーは250 μ l、ダイマーは400 μ l を、尾静脈より投与した。対照として、濾過滅菌したPBS (一) を同様に1日2回、3日間、200 μ l、尾静脈より投与した。両群とも、1群7匹で行った。

(5) s c F v / CHOポリペプチドのモノマー及びダイマーのヒト骨髓腫移植マウスモデルに対する抗腫瘍効果の評価

5 g G、MABL-2抗体は、0.01、0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、一本鎖Fvは、0.004、0.04、0.4、4、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で大腸菌産生の本鎖Fvポリペプチドのダイマーのみさらに160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の用量を設定した。その結果は、下記の表2に示す通り、MABL-2抗体では、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で赤血球凝集が見られたのに対し、一本鎖Fvポリペプチドではモノマー、ダイマー共に赤血球凝集は認められなかった。

表 2

赤血球凝集試験

	対照	0.01	0.1	1	10	100	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
mIgG	-	-	-	-	-	-		
MABL-2 (intact)	-	-	+	+++	+++	++		
	対照	0.004	0.04	0.4	4	40	80	($\mu\text{g}/\text{ml}$)
scFv/CHO モノマー	-	-	-	-	-	-	-	
scFv/CHO ダイマー	-	-	-	-	-	-	-	
	対照	0.004	0.04	0.4	4	40	80	160
								($\mu\text{g}/\text{ml}$)
scFv/E. coli モノマー	-	-	-	-	-	-	-	
scFv/E. coli ダイマー	-	-	-	-	-	-	-	

実施例6 2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む改変抗体sc(Fv)₂及び種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL-2抗体scFv

6. 1 MABL-2抗体sc(Fv)₂発現プラスミドの構築

15 MABL-2抗体由来の2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む改変抗体[sc(Fv)₂]を発現するプラスミドを作製するため、前述pCHOM2 (MABL-2抗体由来のscFvをコードするDNAを含む)を以下に示す通りPCR法により修飾し、得られたDNA断片をpCHOM2に導入した。

PCRに使用するプライマーは、センスプライマーとしてEF1 α をコードするDNAにハイブリダイズするEF1プライマー (配列番号: 30) を使用し、

秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、5'側にリーダー配列を含むH鎖、及び3'側にFLAG配列を含むL鎖のcDNA遺伝子を作製した。得られたH鎖及びL鎖cDNAを鋳型として混合し、KODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を5回繰り返すPCR反応を行い、CFHL-F1及びCFHL-R1プライマーを加えてさらに30サイクル反応することによりリンカーを含まないHL-0タイプのcDNAを作製した。

LHタイプのscFvを作製するために、まずMABL-2のL鎖及びH鎖V領域のcDNAを含むプラスミドpGEM-M2L及びpGEM-M2H（特願平11-63557参照）を鋳型として、それぞれT7（配列番号：37）及びCFLH-R2（配列番号：38）プライマー、CFLH-F2（配列番号：39）及びCFLH-R1（配列番号：40）プライマーを用いてKODポリメラーゼ（東洋紡）にて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、5'側にリーダー配列を含むL鎖、及び3'側にFLAG配列を含むH鎖のcDNA遺伝子を作製した。得られたL鎖及びH鎖cDNAを鋳型として混合し、KODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を5回繰り返すPCR反応を行い、T7及びCFLH-R1プライマーを加えてさらに30サイクル反応した。この反応産物を鋳型とし、CFLH-F4（配列番号：41）及びCFLH-R1プライマーを用いて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行うことによりリンカーを含まないLH-0タイプのcDNAを作製した。

こうして作製したLH-0、HL-0タイプのcDNAを制限酵素EcoRI、BamHI（宝酒造）処理し、XhoI制限酵素切断部位を含まない哺乳動物発現プラスミドINPEP4にLigation High（東洋紡）を用いて導入し、Competent E. coli JM109（ニッポンジーン）を形質転換した。形質転換した大腸菌よりQIAGEN Plasmid Maxi Kit（QIAGEN）にてプラスミドを精製した。こうしてプラスミドpCF2LH-0及びpCF2HL-0を作製した。

次に、リンカーサイズの異なる発現プラスミドを作製するためにHLタイプではpCF2HL-0を鋳型としてCFHL-X3（配列番号：42）、CFHL-

列番号：52) 又はCF2LH-X7 (配列番号：53) のセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとしてベクター配列に相補的なBGH-1プライマーを用いてKODポリメラーゼにて94℃30秒、60℃30秒、72℃1分間の反応を30回繰り返すPCR反応を行い、得られた反応産物を制限酵素XhoI、

5 BamHIにて処理した。得られた断片をpCF2LH-0のXhoI、BamHIサイトにLigation Highを用いて導入し、Competent E. coli DH5α (東洋紡) を形質転換した。形質転換した大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit にてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミドpCF2LH-3、pCF2LH-4、pCF2LH-5、pCF2LH-6及びpCF2LH-7を作製した。

10 更にCOS7細胞での一過的発現に用いる発現プラスミドを作製するために、pCF2LH-0、pCF2LH-3、pCF2LH-4、pCF2LH-5、pCF2LH-6及びpCF2LH-7を制限酵素EcoRI及びBamHI (宝酒造) にて処理し、約800bpの断片をアガロースゲル電気泳動によるゲルからの回収により精製した。得られた断片を哺乳動物細胞発現プラスミドpCOS.1のEcoRI及びBamHIサイトにLigation Highを用いて導入し、Competent E. coli DH5α (東洋紡) を形質転換した。形質転換した大腸菌より QIAGEN Plasmid Maxi Kit にてプラスミドを精製した。こうして、発現プラスミドCF2LH-0/pCOS1、CF2LH-3/pCOS1、CF2LH-4/pCOS1、CF2LH-5/pCOS1、CF2LH-6/pCOS1及びCF2LH-7/pCOS1を作製した。代表的な例として、プラスミドCF2LH-0/pCOS1の構造を図37に示し、これに含まれるMABL2-scFv<LH-0>の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号：54に示す。また各プラスミドのリンカー部分の塩基配列及びアミノ酸配列を図38に示す。

6.3 COS7細胞におけるscFv及びsc(Fv)₂の発現

(1) 有血清培地での培養上清の調製

HLタイプ、LHタイプscFv及びsc(Fv)₂の発現のために、COS7細胞 (JCRB9127、ヒューマンサイエンス振興財団) での一過的発現を行った。COS7細胞は10%牛胎児血清 (HyClone) を含むDMEM培地 (GIBCO

6. 5 フローサイトメトリー

MABL 2-s c F v 及び s c (F v)₂ のヒト Integrin Associated Protein (IAP) 抗原への結合を測定するため、前記 6. 3 (1) にて調製した COS 7 細胞培養上清を用いてフローサイトメトリーを行った。ヒト IAP を発現する
5 マウス白血病細胞株 L 1 2 1 0 細胞 2×10^5 個に、実施例 6. 3 (1) で得られた培養上清あるいは対照として COS 7 細胞の培養上清を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、 $10 \mu\text{g/ml}$ のマウス抗 FLAG 抗体 (SIGMA 社製) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC 標識抗マウス Ig G 抗体 (BECTON DICKINSON 社製) を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、
10 FACS can 装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。その結果、各 COS 7 培養上清中の種々の長さのペプチドリンカーを有する MABL 2-s c F v 及び s c (F v)₂ は、ヒト IAP に対して高い親和性を有することが示された (図 40 a 及び b)。

6. 6 in vitro でのアポトーシス誘起効果

15 前記 1. 3 (1) にて調製した COS 7 細胞培養上清について、ヒト IAP を遺伝子導入した L 1 2 1 0 細胞 (h IAP / L 1 2 1 0) に対するアポトーシス誘導作用を Annexin-V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。

h IAP / L 1 2 1 0 細胞 5×10^4 個に、各ベクターを形質転換した COS 7
20 細胞培養上清あるいはコントロールとして COS 7 細胞培養上清を終濃度 10 % で添加し、24 時間培養した。その後、Annexin-V / PI 染色を行い、FACS can 装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。その結果、COS 7 CM 中の s c F v < HL 3, 4, 6, 7, LH 3, 4, 6, 7 > 及び s c (F v)₂ は h IAP / L 1 2 1 0 細胞に対して顕著な細胞死を誘導した。
25 得られた結果を図 41 にそれぞれ示す。

6. 7 MABL 2-s c F v 及び s c (F v)₂ の CHO 細胞用発現ベクターの構築

前記 MABL 2-s c F v 及び s c (F v)₂ を培養上清から精製することを目的

BRL 社製) にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、更に $0.20\mu\text{m}$ フィルターにて濾過し、それぞれの CM を得た。

同様にして、MABL2-s c F v < HL-0, 3, 4, 6, 7 > 及び < LH-0, 3, 4, 5, 6, 7 > を恒常的に発現する CHO 細胞及びそれらの CM を得た。

6. 9 MABL2-s c F v < HL-5 > のダイマー及び s c (F v)₂ の精製

下記の 2 種類の精製法により前記 6. 8 で得られた CM から MABL2-s c F v < HL-5 > 及び s c (F v)₂ の精製を行った。

< 精製法 1 > HL-5 及び s c (F v)₂ を、そのポリペプチドの C 末端の F l a g 配列を利用した抗 F l a g 抗体アフィニティカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を用いて精製した。150mM NaCl を含む 50mM T r i s 塩酸緩衝液、pH 7.5 (T B S) で平衡化した抗 Flag M2 Affinity gel (SIGMA) で作成したカラム (7.9ml) に前記 6. 8 で得られた CM (1L) を添加し、T B S でカラムを洗浄後、0.1M グリシン塩酸緩衝液、pH 3.5 で s c F v をカラムから溶出させた。得られた画分を SDS/PAGE で分析し、s c F v の溶出を確認した。s c F v 画分を終濃度が 0.01% となるように T w e e n 20 を加え、Centricon-10 (MILLIPORE) で濃縮した。濃縮液を 150mM NaCl 及び 0.01% T w e e n 20 を含む 20mM 酢酸緩衝液、pH 6.0 で平衡化した T S K g e l G 3 0 0 0 S W カラム (7.5×600mm) にかけた。流速 0.4 ml/min で s c F v は 280nm の吸収で検出した。HL-5 は主要ピークとしてダイマーの位置に、s c (F v)₂ はモノマーの位置にそれぞれ溶出された。

< 精製法 2 > HL-5 及び s c (F v)₂ をイオン交換クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイト及びゲル濾過の三工程で精製した。イオン交換クロマトグラフィーでは、HL-5 では Q Sepharose fast flow カラム (ファルマシア) を s c (F v)₂ では SP-sepharose fast flow カラムを用い、第二工程以降は HL-5 と s c (F v)₂ で同じ条件を用いた。

(第一工程) HL-5

HL-5 の CM は、0.02% T w e e n 20 を含む 20mM T r i s 塩酸緩

いずれの精製法においても、HL-5モノマーは殆ど検出されなかったことから、一本鎖Fvのリンカーのアミノ酸残基数が5個程度であれば、効率的に一本鎖Fvのダイマーが形成できることが判明した。HL-5ダイマーおよびsc(Fv)₂はいずれも精製された後も4℃で1ヶ月間安定的に維持された。

5 6. 10 精製scFv<HL-5>のダイマー及びsc(Fv)₂の抗原結合活性評価

10 精製されたMABL2-scFv<HL5>のダイマー及びsc(Fv)₂のヒト Integrin Associated Protein (IAP) 抗原への結合を測定するため、フローサイトメトリーを行った。ヒトIAPを発現するマウス白血病細胞株L1210細胞 (hIAP/L1210) 又は対照としてpCOS1ベクターをトランスフェクションしたL1210細胞 (pCOS1/L1210) 2×10⁵個に、10 μg/mlの精製MABL2-scFv<HL5>のダイマー、MABL2-sc(Fv)₂、陽性対照としてモノクローナル抗体MABL-2、陰性対照としてマウスIgG (Zymed 社製) を加え、氷上にてインキュベーション及び洗浄の後、15 0 μg/mlのマウス抗FLAG抗体 (SIGMA 社製) を加えた。インキュベーション及び洗浄の後、FITC標識抗マウスIgG抗体 (BECTON DICKINSON 社製) を加えた。再度インキュベーション及び洗浄の後、FACSscan装置 (BECTON DICKINSON 社製) にて蛍光強度を測定した。

20 その結果、精製MABL2-scFv<HL5>のダイマー及びMABL2-sc(Fv)₂はhIAP/L1210細胞に特異的に結合したことにより、scFv<HL5>のダイマー及びsc(Fv)₂がヒトIAPに対して高い親和性を有することが示された (図42)。

6. 11 精製scFv<HL-5>のダイマー及びsc(Fv)₂の in vitro アポトーシス誘起効果

25 精製したMABL2-scFv<HL5>のダイマー及びsc(Fv)₂について、ヒトIAPを遺伝子導入したL1210細胞 (hIAP/L1210) 及びヒト白血病細胞株CCRF-CEMに対するアポトーシス誘導作用をAnnexin-V (BOEHRINGER MANNHEIM 社製) 染色により検討した。

表 3

ヒト赤血球凝集試験

希釈液: PBS															($\mu\text{g/ml}$)
cont	28.9	14.45	7.225	3.6125	1.8063	0.9031	0.4516	0.2258	0.1129	0.0564	0.0282	0.0141	0.0071	0.0035	0.0018
MAEL2-sc (Fv)2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cont	28.0	14.0	7.0	3.5	1.75	0.875	0.4375	0.2188	0.1094	0.0547	0.0273	0.0137	0.0068	0.0034	0.0017
MAEL2-sc (Fv) <HL5>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cont	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049
MAEL2 (intact)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-
mIgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

希釈液: Acetate Buffer															($\mu\text{g/ml}$)
cont	80	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0.1563	0.0781	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049
MAEL2 (intact)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

遺伝子の塩基配列（配列番号 55）を用いて、その 5' 末端にヒト抗体遺伝子由来のリーダー配列（配列番号 56）（*Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 63-69）を連結させることで設計した。設計した塩基配列はそれぞれ 15 b p のオーバーラップ配列を持つように 4 本のオリゴヌクレオチド（12B5VH-1、12B5VH-2、12B5VH-3、12B5VH-4）に分割し、12B5VH-1（配列番号 57）及び 12B5VH-3（配列番号：59）はセンス方向で、12B5VH-2（配列番号：58）及び 12B5VH-4（配列番号：60）はアンチセンス方向でそれぞれ合成した。各合成オリゴヌクレオチドはそれぞれの相補性によりアッセンブリさせた後、外側プライマー（12B5VH-S 及び 12B5VH-A）を加え、全長の遺伝子を増幅した。なお、12B5VH-S（配列番号：61）は前方プライマーでリーダー配列の 5' 末端にハイブリダイズし、且つ Hind III 制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、また 12B5VH-A（配列番号：62）は後方プライマーで H 鎖 V 領域の C 末端をコードする塩基配列にハイブリダイズし、且つ スプライドナー配列ならびに BamHI 制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

PCR 溶液 100 μ l は、5 μ l の 10 \times PCR Gold Buffer II、1.5 mM MgCl₂、0.08 mM dNTPs（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）、5 ユニットの DNA ポリメラーゼ AmpliTaq Gold（以上 PERKIN ELMER 社製）、2.5 μ M ずつの合成オリゴヌクレオチド 12B5VH-1～4 を含有し、94 $^{\circ}$ C の初期温度にて 9 分間そして次に 94 $^{\circ}$ C にて 2 分間、55 $^{\circ}$ C にて 2 分間及び 72 $^{\circ}$ C にて 2 分間のサイクルを 2 回反復した後、100 pmol ずつの外側プライマー 12B5VH-S 及び 12B5VH-A を加え、さらに 94 $^{\circ}$ C にて 30 秒間、55 $^{\circ}$ C にて 30 秒間及び 72 $^{\circ}$ C にて 1 分間のサイクルを 35 回反復した後、反応混合物を更に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した。

PCR 生成物は 1.5% 低融点アガロースゲル（Sigma 社製）を用い精製した後、制限酵素 BamHI 及び Hind III で消化し、ヒト H 鎖発現ベクター HEF-g γ 1 にクローニングした。DNA 配列決定の後、正しい DNA 配列を有する DNA 断片を含むプラスミドを HEF-12B5H-g γ 1 と命名した。

B5VL-S (配列番号: 73) は前方プライマーでリーダー配列の5'末端にハイブリダイズし、且つHind III 制限酵素認識配列ならびにコザック配列を持つように、また12B5VL-A (配列番号: 74) は後方プライマーでL鎖V領域のC末端をコードする塩基配列にハイブリダイズし、且つスプライスドナー配列ならびにBamHI 制限酵素認識配列を持つようにそれぞれ設計した。

PCR反応は上記と同様に行い、PCR生成物は1.5%低融点アガロースゲル (Sigma 社製) を用い精製した後、制限酵素BamHI及びHind III で消化し、ヒトL鎖発現ベクターHEF-gκにクローニングした。DNA配列決定の後、正しいDNA配列を有するDNA断片を含むプラスミドをHEF-12B5L-gκと命名した。本プラスミドHEF-12B5L-gκに含まれる再構成12B5L鎖V領域の塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 75に示す。

7.3 再構成12B5一本鎖Fv(scFv)の作製

再構成12B5抗体一本鎖Fvは12B5VH-リンカー-12B5VLの順とし、そのC末端には検出及び精製を容易にするためにFLAG配列 (配列番号: 76) を付加することで設計した。さらに、リンカー配列は(Gly₄Ser)₃の15アミノ酸からなるリンカー配列を用い、再構成12B5一本鎖Fv(sc12B5)を構築した。

(1) 15アミノ酸からなるリンカー配列を用いた再構成12B5一本鎖Fvの作製

15アミノ酸からなるリンカーを用いた再構成12B5抗体一本鎖Fvをコードする遺伝子は12B5H鎖V領域、リンカー領域、及び12B5L鎖V領域をそれぞれPCR法を用いて増幅し、連結することにより構築した。この方法を図47に模式的に示す。再構成12B5一本鎖Fvの作製のために6個のPCRプライマー (A~F) を使用した。プライマーA、C及びEはセンス配列を有し、プライマーB、D及びFはアンチセンス配列を有する。

H鎖V領域のための前方プライマー12B5-S (プライマーA、配列番号: 77) は、H鎖リーダー配列の5'末端にハイブリダイズし且つEcoRI制限酵素認識部位を有するように設計した。H鎖V領域のための後方プライマーHuV

第一PCR段階の溶液50 μ lは、5 μ lの10 \times PCR Gold Buffer II、1.5mM MgCl₂、0.08mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製)、100pmole ずつの各プライマー及び100ngの各鋳型DNAを含有し、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、55 $^{\circ}$ Cにて30秒間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分間のサイクルを35回反復した後、反応混合物を更に72 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した。

PCR生成物A-B、C-D、及びE-Fは第二PCRでアッセンブリした。第二PCRにおいて、鋳型として1 μ lの第一PCR反応物A-B、0.5 μ lのPCR反応物C-D及び1 μ lのPCR反応物E-F、10 μ lの10 \times PCR Gold Buffer II、1.5mM MgCl₂、0.08mM dNTPs、5ユニットのDNAポリメラーゼ AmpliTaq Gold (以上 PERKIN ELMER 社製) を含有する98 μ lのPCR混合液を、94 $^{\circ}$ Cの初期温度にて9分間そして次に94 $^{\circ}$ Cにて2分間、65 $^{\circ}$ Cにて2分間及び72 $^{\circ}$ Cにて2分間のサイクルを2回反復した後、それぞれ100pmole ずつのプライマーA及びFを加えた。そして94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、55 $^{\circ}$ Cにて30秒間及び72 $^{\circ}$ Cにて1分間のサイクルを35回反復した後、反応混合物を72 $^{\circ}$ Cにて5分間加熱した。

第二PCRにより生じたDNA断片を1.5%低融点アガロースゲルを用いて精製し、EcoRI及びNotIで消化し、得られたDNA断片をpCHO1ベクターおよびpCOS1ベクター (特願平8-255196) にクローニングした。なお、本発現ベクターpCHO1は、DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (WO 92/19759 参照) から、EcoRI及びSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造社製) を連結することにより構築したベクターである。DNA配列決定の後、再構成12B5一本鎖Fvの正しいアミノ酸配列をコードするDNA断片を含むプラスミドをpCHO-sc12B5及びpCOS-sc12B5と命名した。本プラスミドpCHO-sc12B5及びpCOS-sc12B5に含まれる再構成12B5一本鎖Fvの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号: 84に示す。

7. 4 動物細胞を用いた各12B5抗体 (IgG、Fab) 及び一本鎖Fvポ

発現量の高いクローンを12B5一本鎖Fvの産生細胞株として選択した。10 nMメトトレキサート (SIGMA 社製) を含む無血清培地CHO-S-SFM II (GIBCO BRL 社製) にて培養後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去して培養上清を得た。

5 7. 5 CHO細胞産生の12B5由来の一本鎖Fvの精製

7. 4で得られた12B5一本鎖Fv発現CHO産生株の培養上清からの精製は、抗FLAG抗体カラム及びゲル濾過カラムにより行った。

(1) 抗FLAG抗体カラム

10 培養上清は、PBSで平衡化した抗FLAG M2アフィニティーゲル (SIGMA 社製) に添加した。同緩衝液でカラムを洗浄後、緩衝液を0.1Mグリシン塩酸緩衝液 (pH 3.5) でカラムに吸着した蛋白質を溶出した。溶出画分は、溶出後直ちに1Mトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加えて中和した。SDS-PAGEで溶出画分を分析し、一本鎖Fvが確認された画分をCentricon-10 (MILLIPORE 社製) を用いて濃縮した。

15 (2) ゲル濾過

(1) の濃縮液は、0.01% Tween 20を含むPBSで平衡化したSuperdex 200カラム (10×300mm、AMERSHAM PHARMACIA 社製) に添加した。

20 sc12B5は2つのピーク (A、B) に分かれて溶出した (図48を参照)。画分A、Bを14%-SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて分析した。サンプルを還元剤添加、非添加で処理し、Laemmliの方法に準じて電気泳動を行い、泳動後蛋白質をクマシーブリリアントブルー染色した。図49に示すように、画分A、Bいずれも還元剤の添加の有無に関わらず、見かけ上の分子量約31 kDに単一バンドを与えた。画分A及びBをSuperdex 200 PC 3.2/30 (3.2×300mm、AMERSHAM PHARMACIA 社製) を用いたゲル濾過により分析した結果、画分Aでは見かけ上の分子量約44 kD、画分Bでは同22 kDに溶出された (図50a及びbを参照)。以上の結果から、画分Aはsc12B5一本鎖Fvの非共有結合性ダイマーで、Bはモノマーである。

マーの s c 1 2 B 5 をそれぞれ単離し（図 5 0 を参照）、それらの M P L に対するアゴニスト活性を測定した結果、図 5 1 及び 5 2 に示すように s c 1 2 B 5 モノマーでは E D 5 0 値が 4 4 3 8 . 7 n M と C O S - 7 細胞の培養上清を用いた結果に比べ、アゴニスト活性の減弱が確認された。それに対し、二価の抗原結合部位を持つ一本鎖 F v （ s c 1 2 B 5 ダイマー）では一価の s c 1 2 B 5 に対し約 4 0 0 倍強いアゴニスト活性を示した（ E D 5 0 ; 1 0 . 1 n M ）。さらに、二価の一本鎖 F v ではヒト T P O ならびに 1 2 B 5 I g G のアゴニスト活性と同等もしくはそれ以上のアゴニスト活性を示した。

10 図面の簡単な説明

図 1. ヒト I g G 1 抗体が、ヒト I A P を発現する L 1 2 1 0 細胞（ h I A P / L 1 2 1 0 ） に結合しないことを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

15 図 2. キメラ M A B L - 1 抗体が、ヒト I A P を発現する L 1 2 1 0 細胞（ h I A P / L 1 2 1 0 ） に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

図 3. キメラ M A B L - 2 抗体が、ヒト I A P を発現する L 1 2 1 0 細胞（ h I A P / L 1 2 1 0 ） に特異的に結合することを示すフローサイトメトリーの結果を示す図である。

20 図 4. 本発明にかかる一本鎖 F v の作成方法を模式的に示す図である。

図 5. 本発明の一本鎖 F v をコードする D N A を、大腸菌にて発現させるために使用可能な発現プラスミドの一例の構造を示す。

図 6. 本発明の一本鎖 F v をコードする D N A を、哺乳動物細胞にて発現させるために使用する発現プラスミドの一例の構造を示す。

25 図 7. 実施例 5 . 4 で得られたウエスタンブロットの結果を示す写真である。左側より、分子量マーカー（上から 9 7 . 4 、 6 6 、 4 5 、 3 1 、 2 1 . 5 、 1 4 . 5 k D a を示す）、 p C H O 1 導入 C O S 7 細胞培養上清、 p C H O M 2 導入細胞培養上清。 p C H O M 2 導入細胞培養上清に再構成 M A B L - 2 抗体一本鎖 F v

特異的にアポトーシスを誘起することを示す。

図17. 実施例5. 7のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、CCRF-CEM細胞には、コントロールとしてのpCHO1/COS7細胞培養上清抗体はアポトーシスを誘起しないことを示す（最終濃度50%）。

- 5 図18. 実施例5. 7のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、CCRF-CEM細胞に対し、MABL2-scFv/COS7細胞培養上清抗体が特異的にアポトーシスを誘起することを示す（最終濃度50%）。

- 10 図19. 実施例5. 9のCHO細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvの精製過程において、Blue-sepharose カラムで得られた画分をハイドロキシアパタイトカラムを用いて精製した際のクロマトグラムを示す図であり、主要なピークとして画分A、画分Bが得られたことを示す。

- 15 図20. 実施例5. 9の(2)で得られた画分A、画分Bについてゲル濾過により精製した結果を示す図であり、画分Aでは見かけ上の分子量約36kD、画分Bでは同76kDの位置に主要ピークが（それぞれAI及びBI）が溶出したことを示す。

図21. 実施例5. 9のCHO細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvの精製過程において得られた画分をSDS-PAGEで分析した図であり、何れも分子量約35kDに単一のバンドのみであることを示す。

- 20 図22. CHO細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvの精製において得られた画分AI及びBIをゲル濾過により分析した結果を示す図であり、画分AIはモノマーからなり、画分BIはダイマーからなることを示す。

図23. 本発明の一本鎖FvをコードするDNAを、大腸菌の菌体内にて発現させるために使用可能な発現プラスミドの一例の構造を示す。

- 25 図24. 実施例5. 12の大腸菌細胞産生のMABL-2抗体由来の一本鎖Fvポリペプチドの精製において、得られた粗製物をゲル濾過カラムを用いて精製した結果を示す図であり、各ピークはそれぞれ大腸菌細胞産生の一本鎖Fvのモノマー、ダイマーを示す。

図25. 実施例5. 13のアポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、hIA

図33. 腫瘍移植後のマウスの生存日数を表しており、 $s c F v / C H O$ ダイマー投与群において生存期間が顕著に延長されていることを示している。

図34. MABL-2抗体由来の2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む改変抗体 $[s c (F v)_2]$ を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

5 図35. [H鎖] - [L鎖] となるようにV領域を連結し、且つペプチドリンカーを含まない $s c F v$ (HLタイプ) を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

図36. HLタイプのポリペプチドの構造およびペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す。

10 図37. [L鎖] - [H鎖] となるようにV領域を連結し、且つペプチドリンカーを含まない $s c F v$ (LHタイプ) を発現するプラスミドの一例の構造を示す。

図38. LHタイプのポリペプチドの構造およびペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す。

15 図39. 実施例6. 4におけるウェスタンブロッティングの結果を示す図であり、2つのH鎖V領域及び2つのL鎖V領域を含む改変抗体 $s c (F v)_2$ 及び種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL-2抗体 $s c F v$ が発現していることを示す。

20 図40a及びb. 実施例6. 3 (1) にて調製したCOS7細胞培養上清を用いたフローサイトメトリーの結果を示す図であり、種々の長さのペプチドリンカーを有するMABL2- $s c F v$ 及び $s c (F v)_2$ は、ヒトIAPに対して高い親和性を有することを示す。

図41. 実施例6. 6のアポトーシス誘導効果の結果を示す図であり、 $s c F v < H L 3, 4, 6, 7, L H 3, 4, 6, 7 >$ 及び $s c (F v)_2$ はhIAP/L1210細胞に対して顕著な細胞死を誘導することを示す。

25 図42. 実施例6. 10の抗原結合評価の結果を示す図であり、 $s c F v < H L 5 >$ のダイマー及び $s c (F v)_2$ がヒトIAPに対して高い親和性を有することを示す。

図43. 実施例6. 11のin vitro アポトーシス誘起効果の結果を示す図であり、MABL2- $s c F v < H L 5 >$ のダイマー及びMABL2- $s c (F v)_2$ はhI

本発明の改変抗体は、細胞表面上の分子を架橋することにより該細胞内にシグナルを伝達しうるアゴニスト作用を有しており、また抗体分子（whole IgG）と比較して低分子化が達成されているため、組織、腫瘍への移行性に優れているという特徴を有している。さらに本発明の改変抗体は、元のモノクローナル抗体と比較して顕著に高い活性を有しているが、これは本発明の改変抗体が抗体分子に比べてよりリガンドに近い形態であるためと考えられる。従って、当該改変抗体はシグナル伝達アゴニストとして使用することができ、そして抗体分子を本発明の改変抗体にすることにより、細胞間の架橋などによる副作用を軽減し、且つ細胞表面上の分子を架橋して所望の作用のみを誘起しうる新規な医薬品を提供される。本発明の改変抗体を有効成分とする医薬製剤は、癌、炎症、ホルモン異常、並びに白血病、悪性リンパ腫、再生不良性貧血、骨髓異形成症候群および真性多血症などの血液疾患の予防及び／又は治療薬として有用である。

ロイキン-11 (IL-11) 受容体、インターロイキン-12 (IL-12) 受容体、インターロイキン-13 (IL-13) 受容体、インターロイキン-15 (IL-15) 受容体、インターフェロン- α (IFN- α) 受容体、インターフェロン- β (IFN- β) 受容体、インターフェロン- γ (IFN- γ) 受容体、成長ホルモン (GH) 受容体、インスリン受容体、血液幹細胞増殖因子 (SCF) 受容体、血管上皮増殖因子 (VEGF) 受容体、上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体、神経成長因子 (NGF) 受容体、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 受容体、血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) 受容体、白血球遊走阻止因子 (LIF) 受容体、毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体、オンコスタチンM (OSM) 受容体および Notchファミリー受容体からなる群から選択される請求項9に記載の改変抗体。

11. アゴニスト作用が、アポトーシス誘導、細胞増殖誘導または細胞分化誘導である、請求項1~10のいずれか1項に記載の改変抗体。

12. L鎖V領域及びH鎖V領域が、同一のモノクローナル抗体由来である、請求項1~11のいずれか1項に記載の改変抗体。

13. 元のモノクローナル抗体と比較して改善されたアゴニスト作用を示す、請求項1~12のいずれか1項に記載の改変抗体。

14. 請求項1~13のいずれか1項に記載の改変抗体をコードするDNA。

15. 請求項1~13のいずれか1項に記載の改変抗体を産生する動物細胞。

16. 請求項1~13のいずれか1項に記載の改変抗体を産生する微生物。

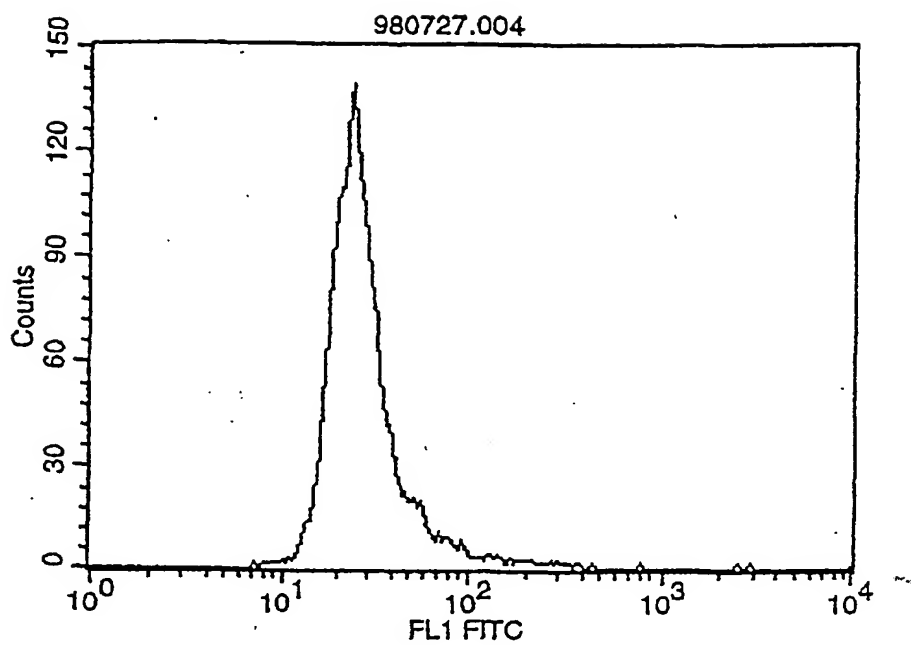
17. 請求項1~13のいずれか1項に記載の改変抗体のアゴニストとしての使用。

18. 一本鎖Fvを産生する宿主動物細胞を無血清培地で培養して、該培地中に一本鎖Fvを分泌させ、該培地中で形成された一本鎖Fvダイマーを精製することを特徴とする一本鎖Fvダイマーの製造方法。

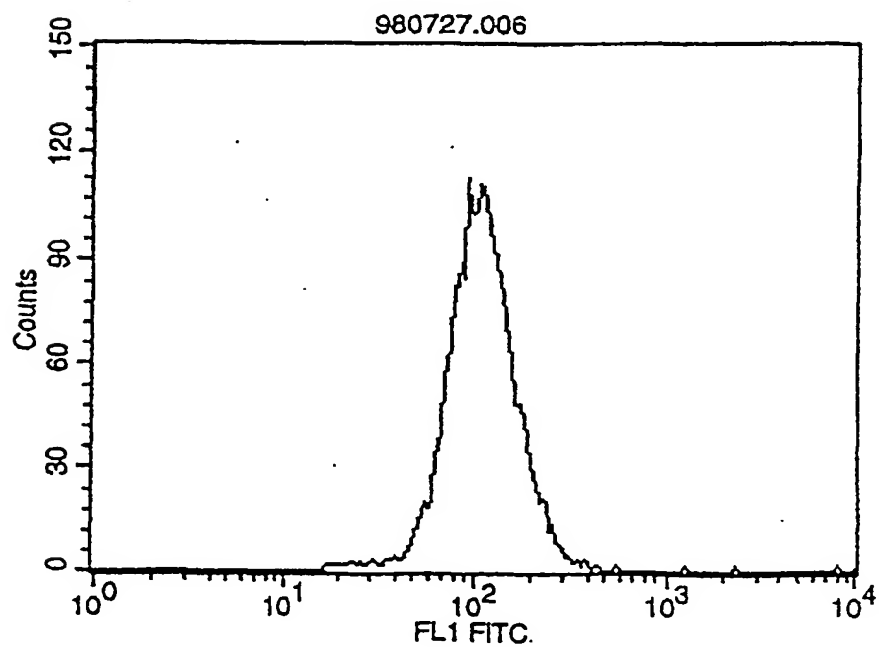
19. 一本鎖Fvを産生する宿主動物細胞を無血清培地で培養して、該培地中に一本鎖Fvを分泌させ、該培地中で該一本鎖Fvのダイマーを形成させることを

1/43

☒ 1



☒ 2



2/43

图 3

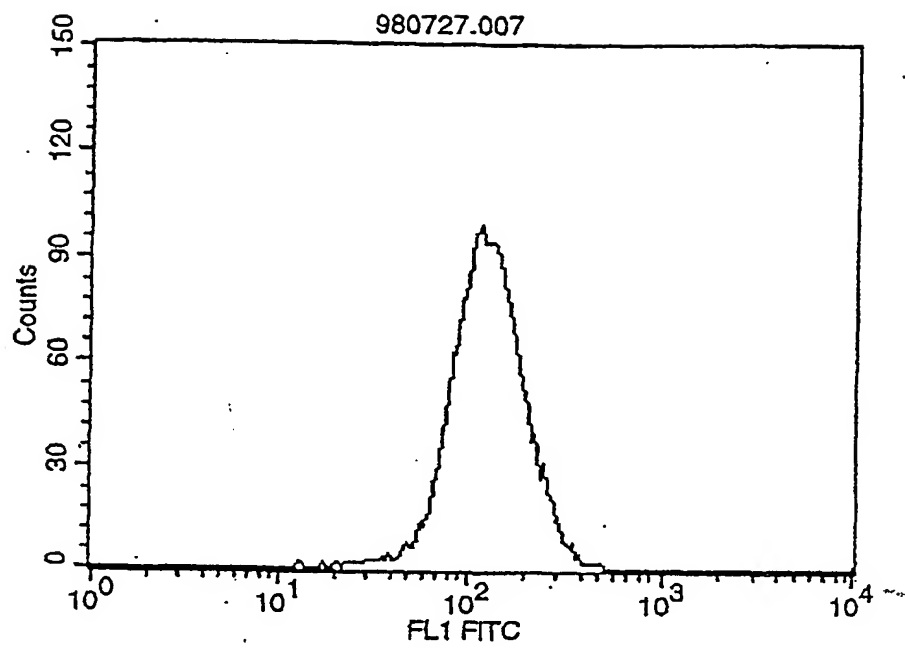


図 4

3/43

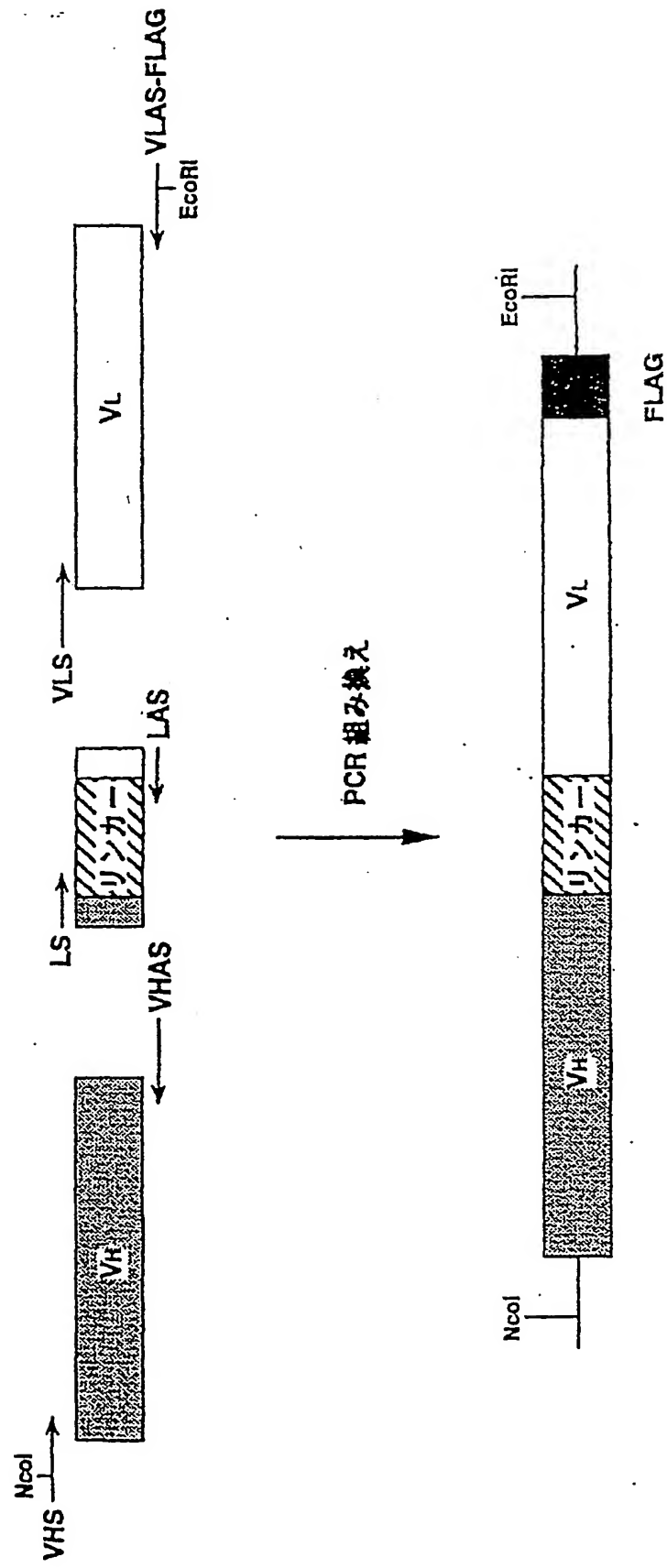


図 5

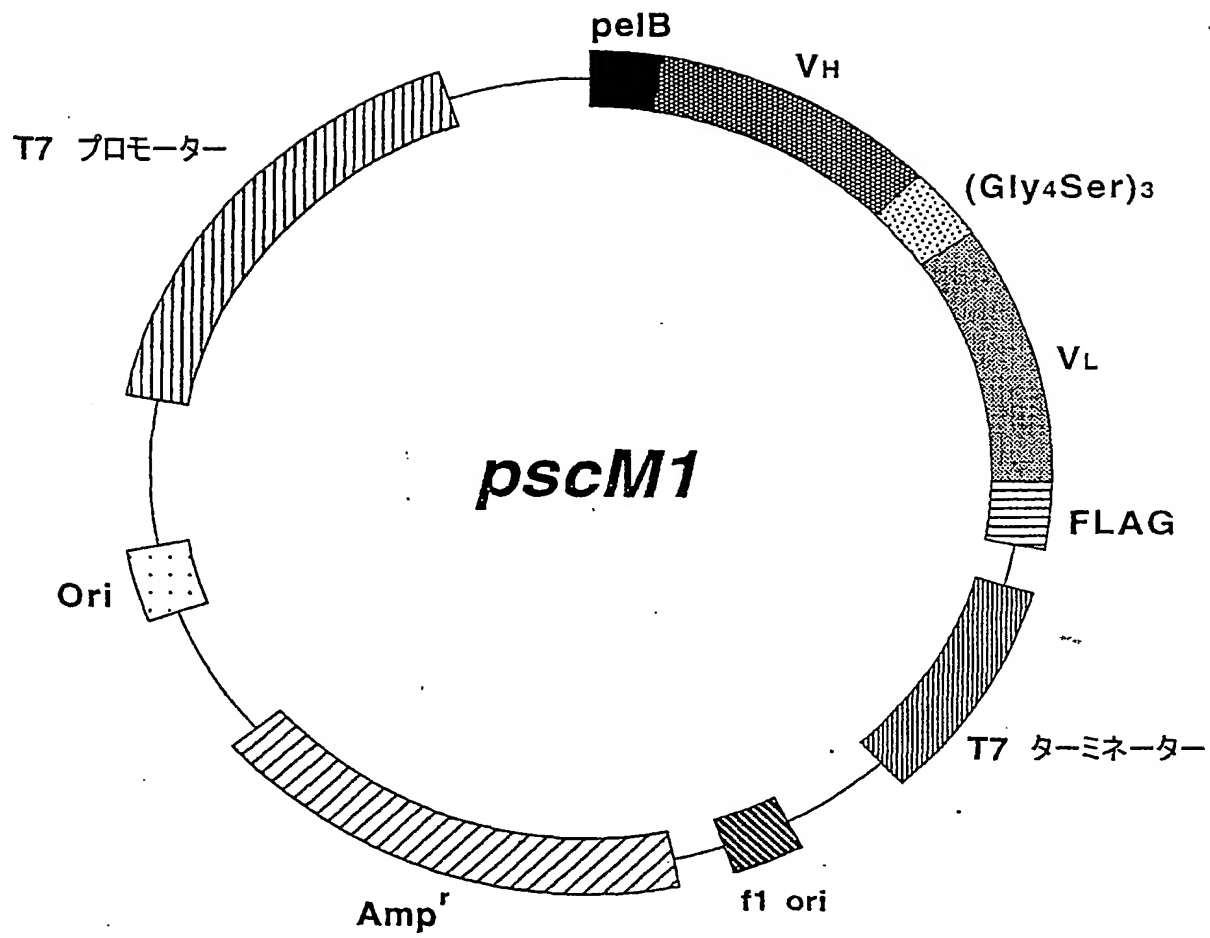


図 6

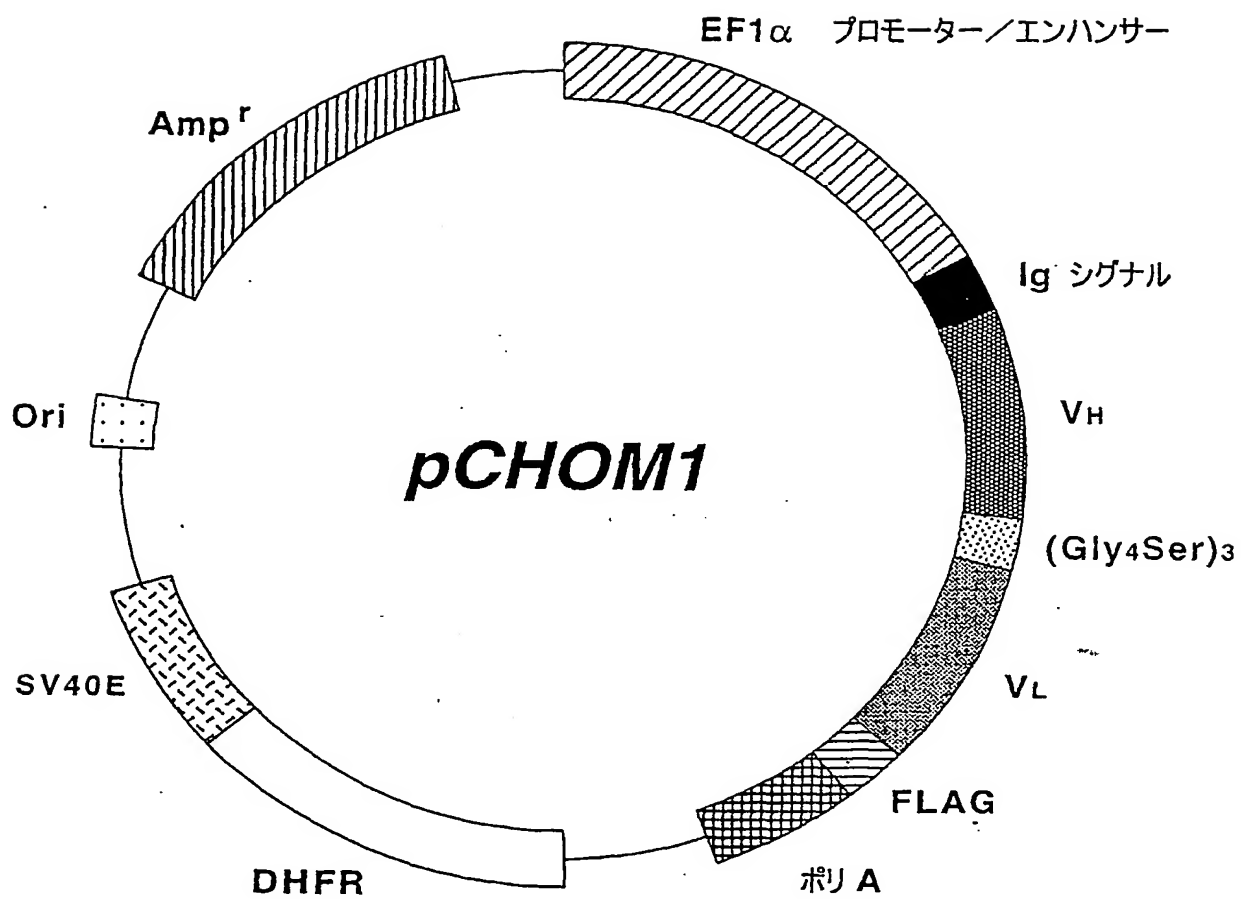
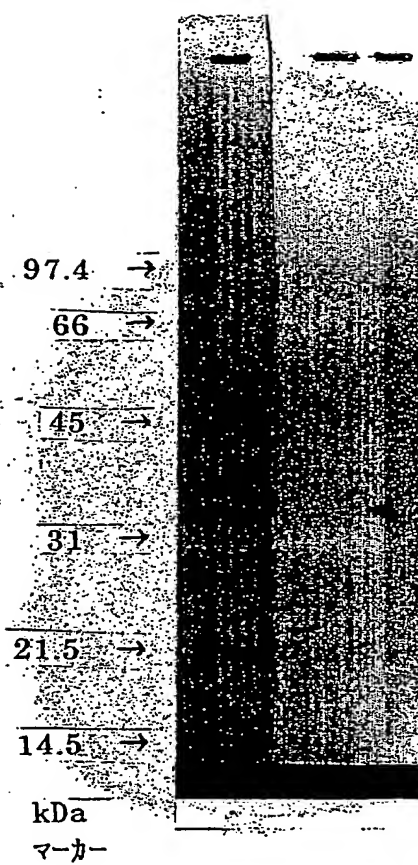
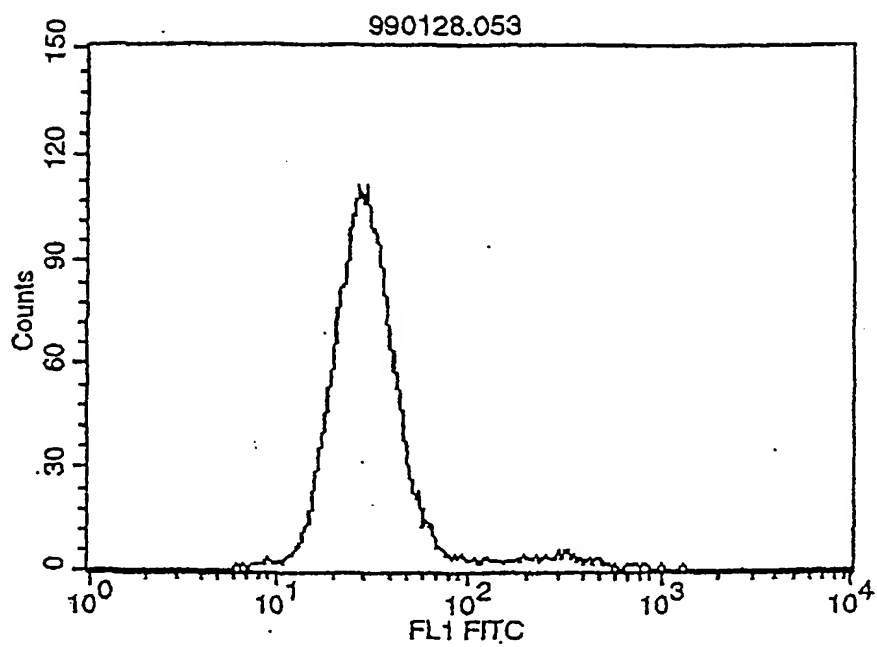


図 7

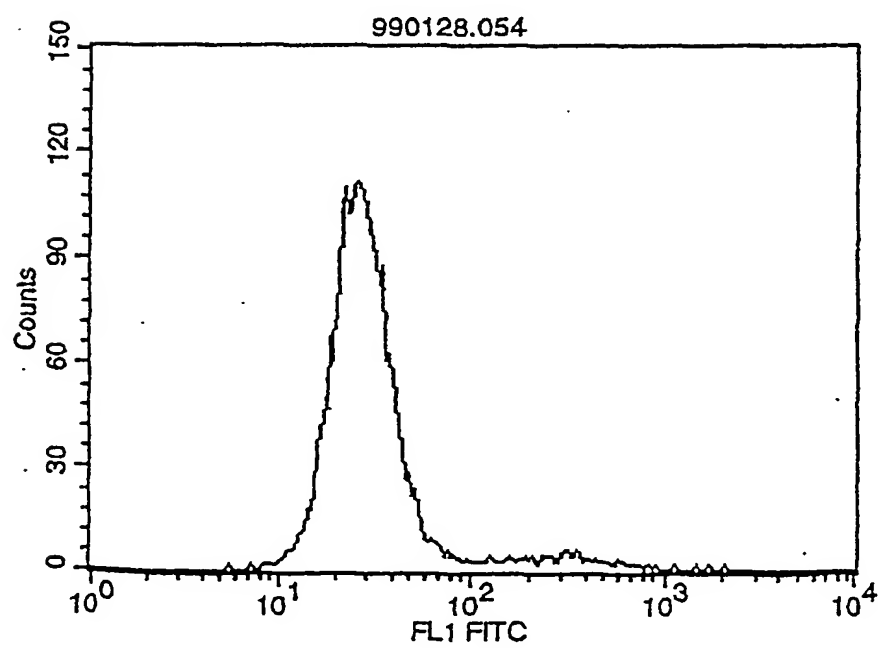


7/43

☒ 8

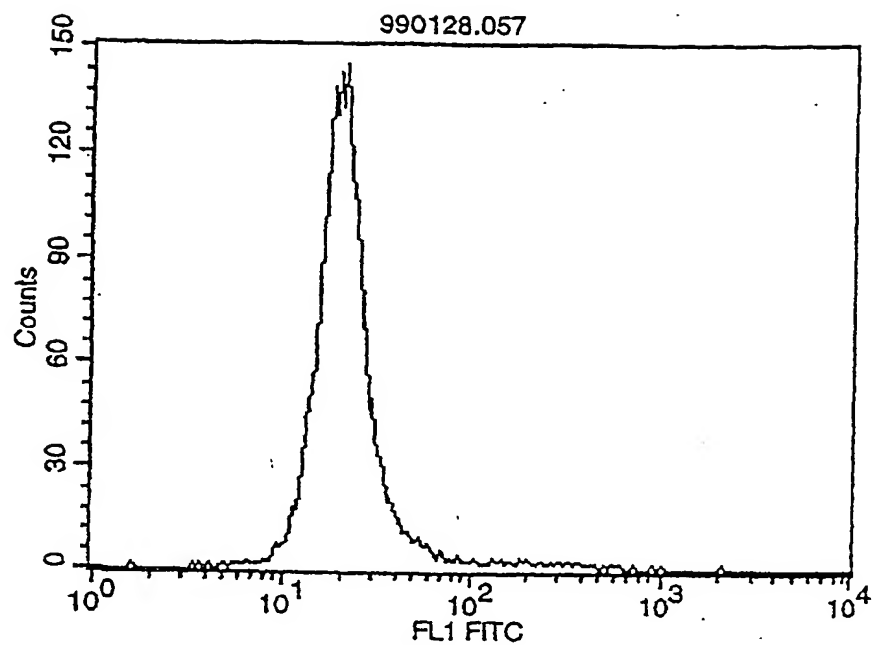


☒ 9

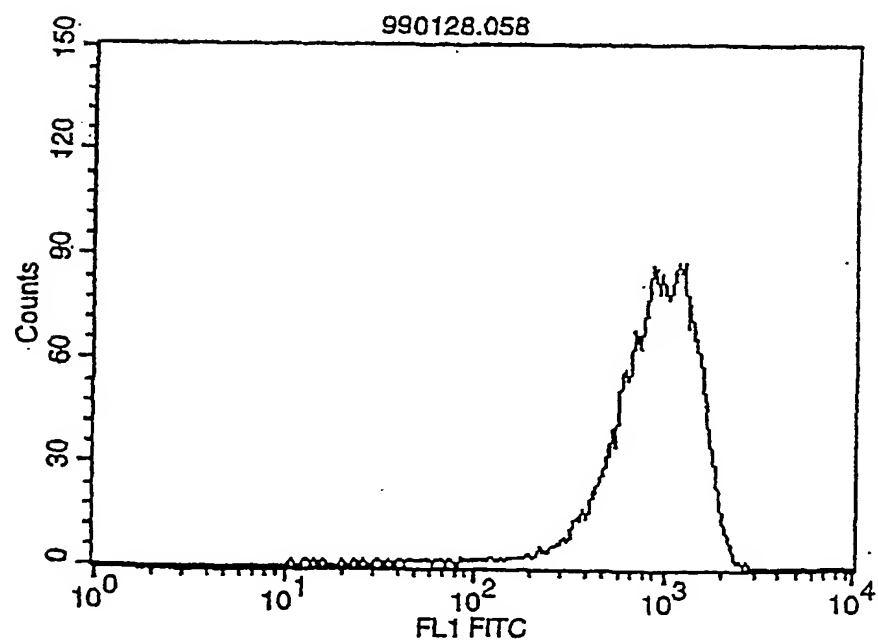


8/43

☒ 1 0



☒ 1 1



9/43

図 1 2

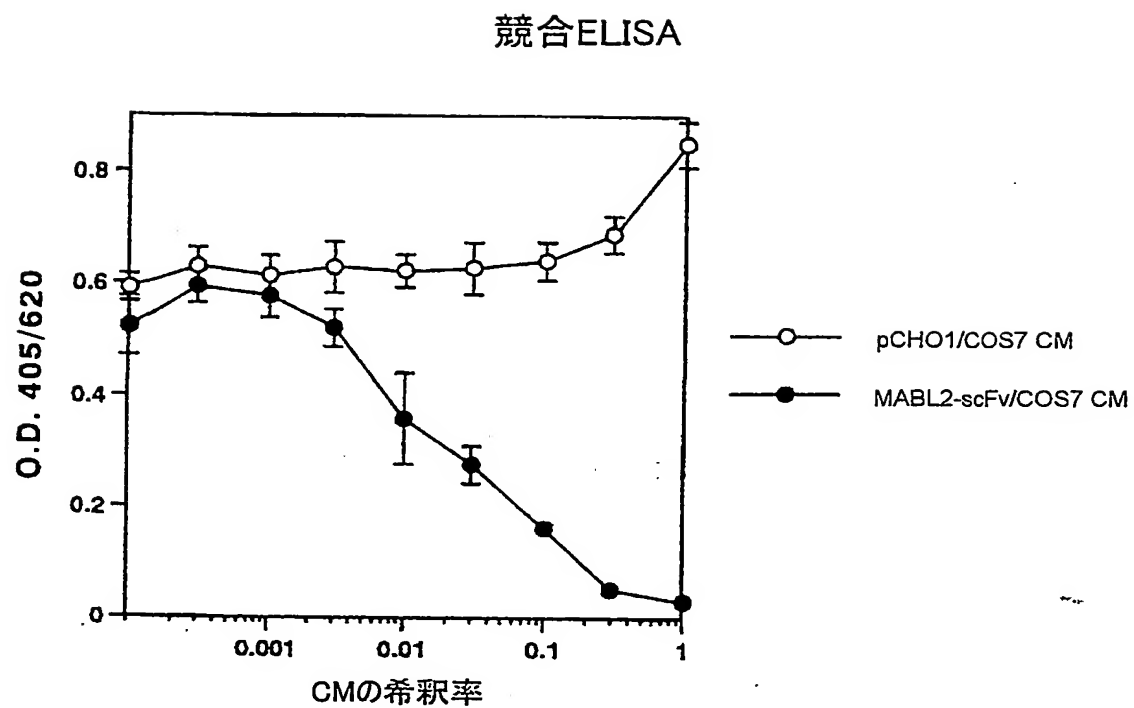
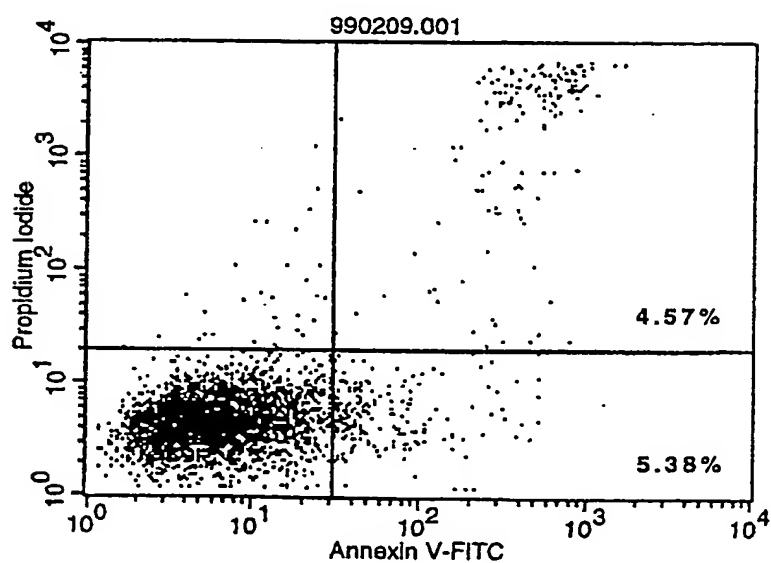
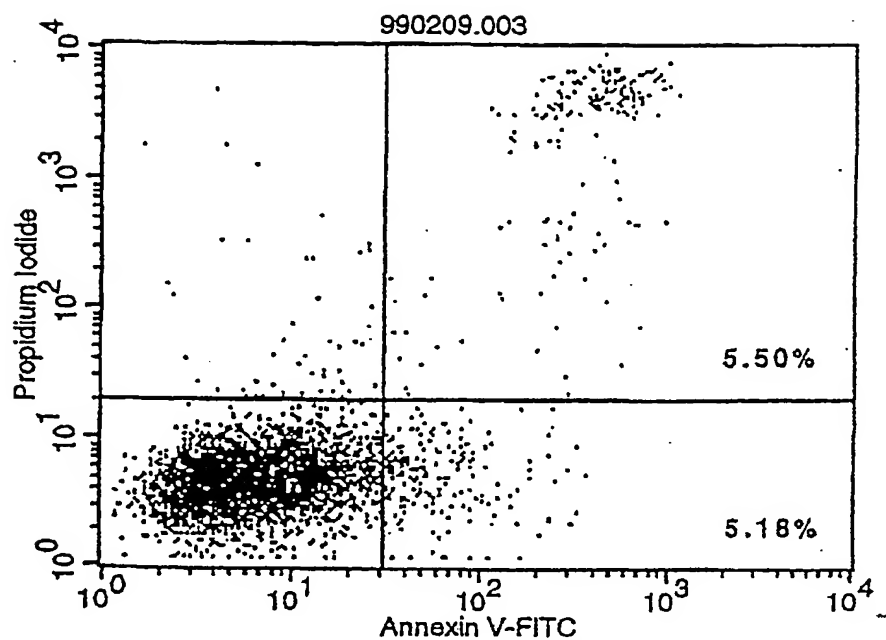


図 1 3

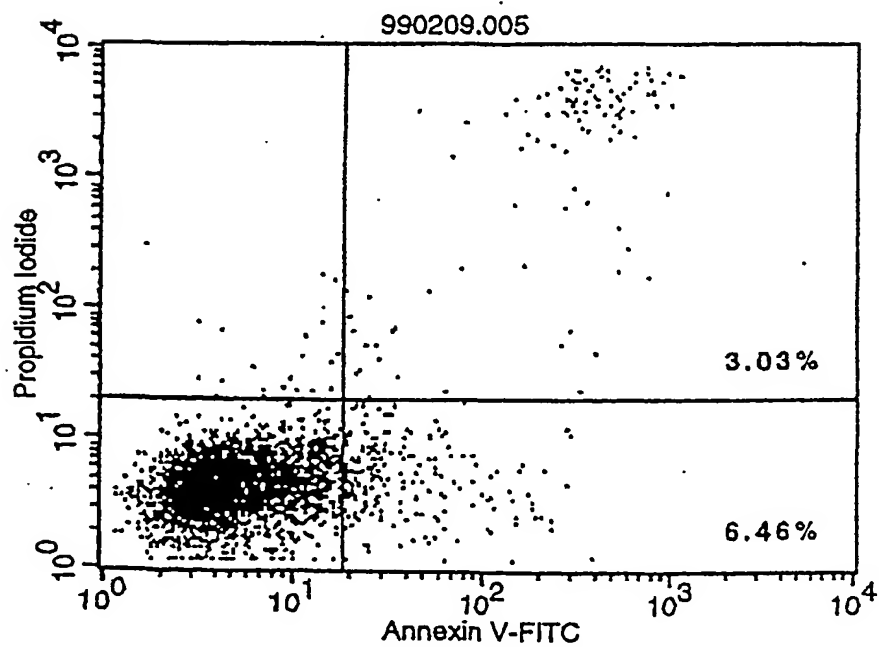


10/43

☒ 1 4



☒ 1 5



11/43

图 16

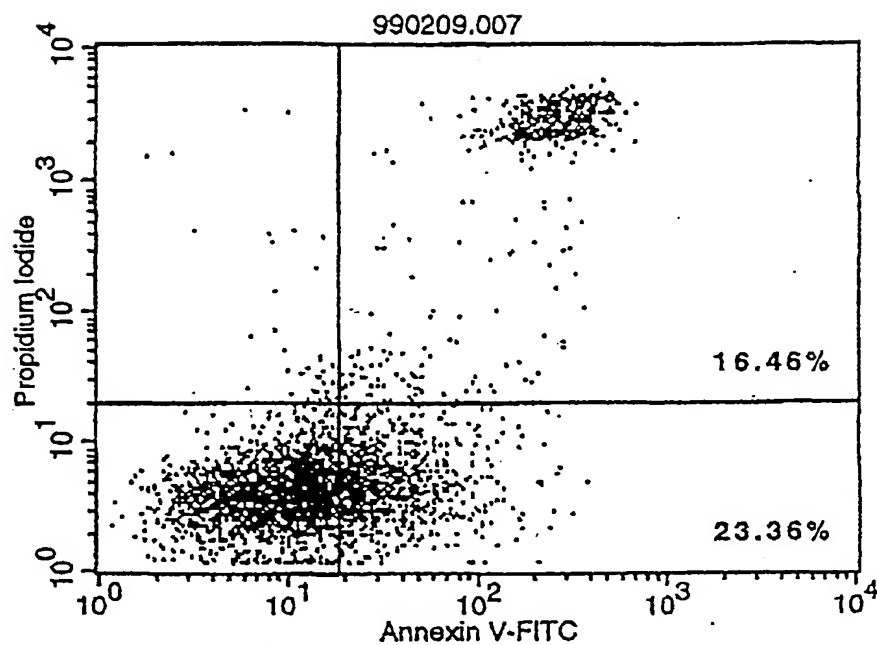
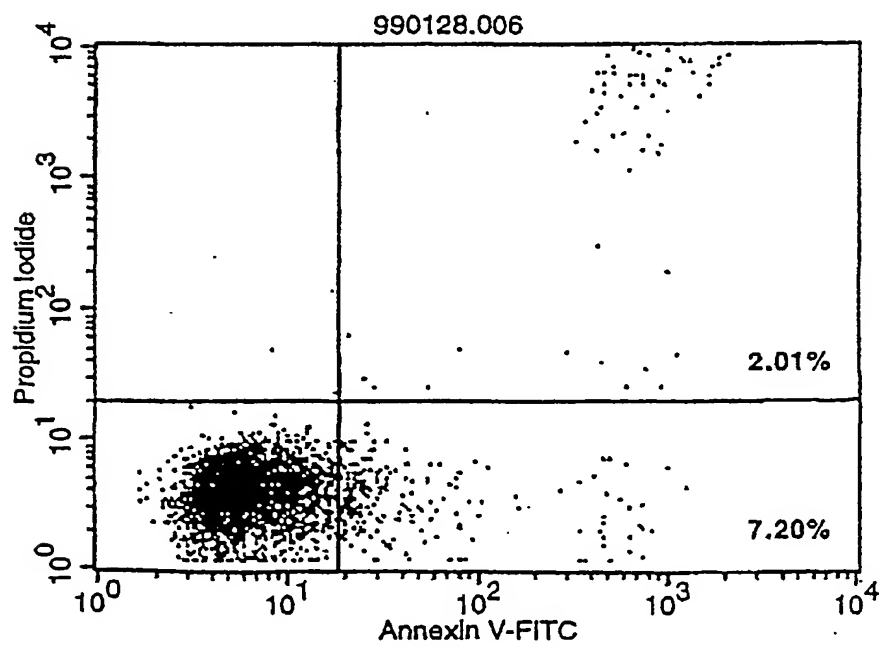
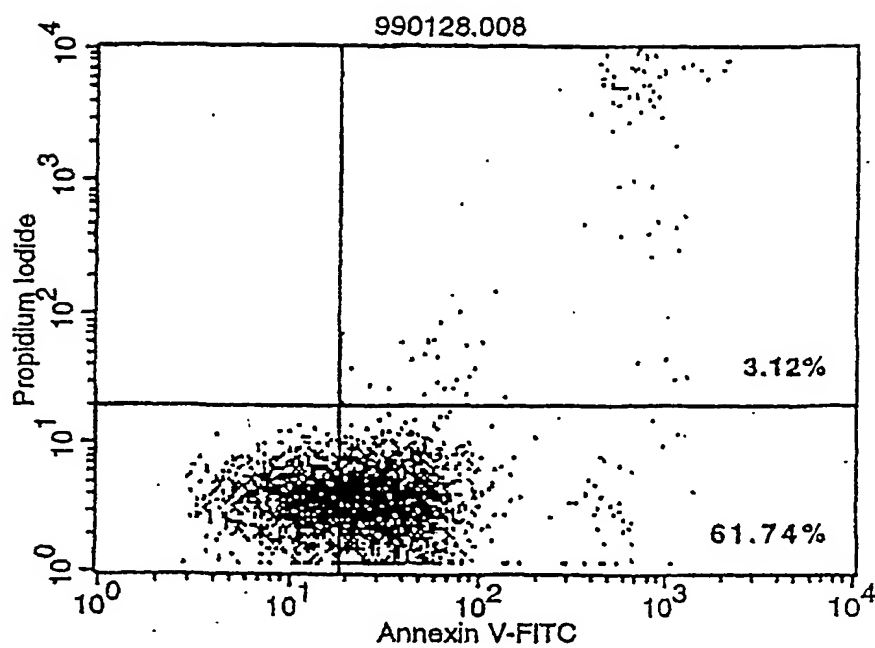


图 17



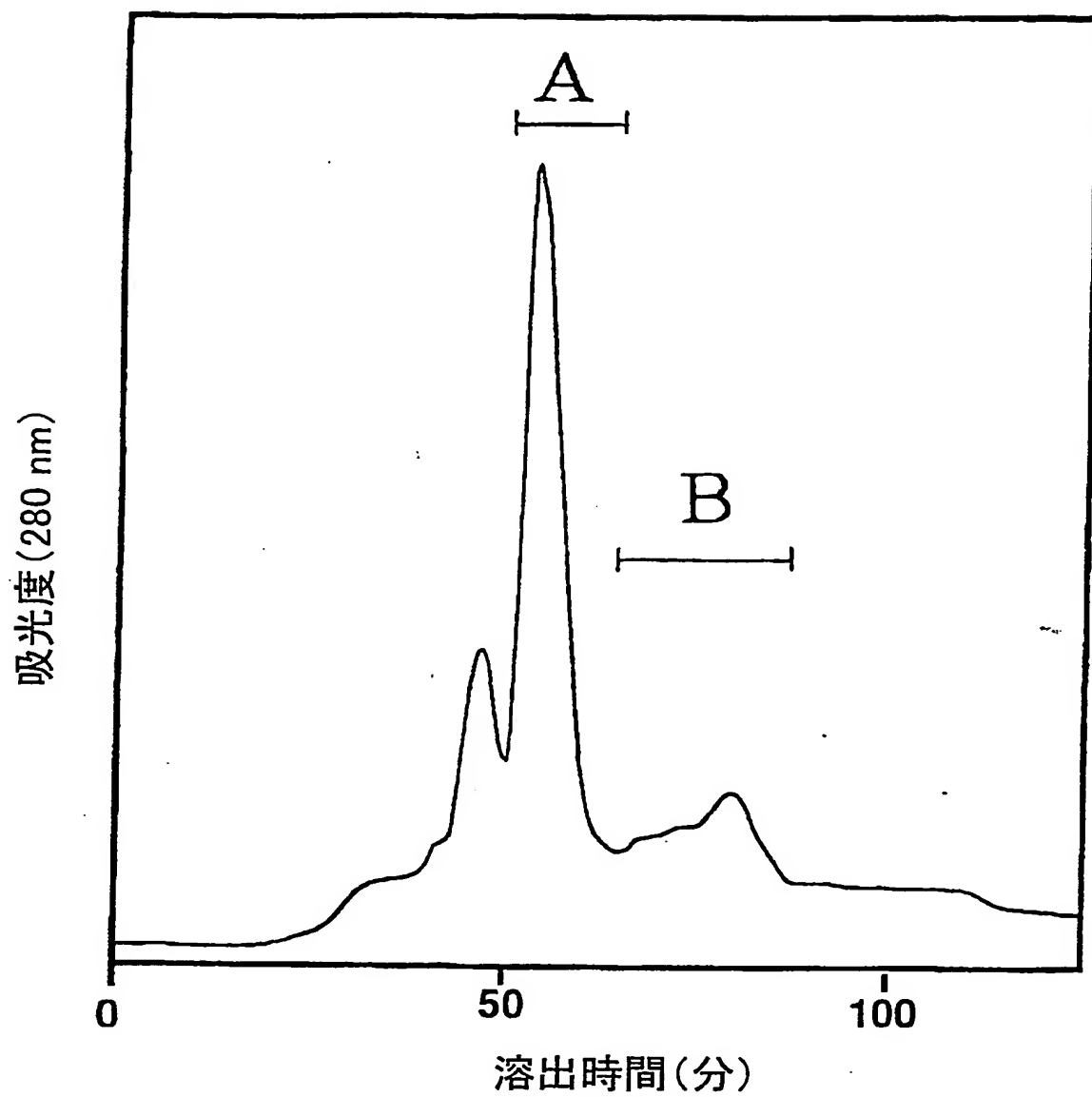
12/43

18



13/43

図 19



14/43

図 20

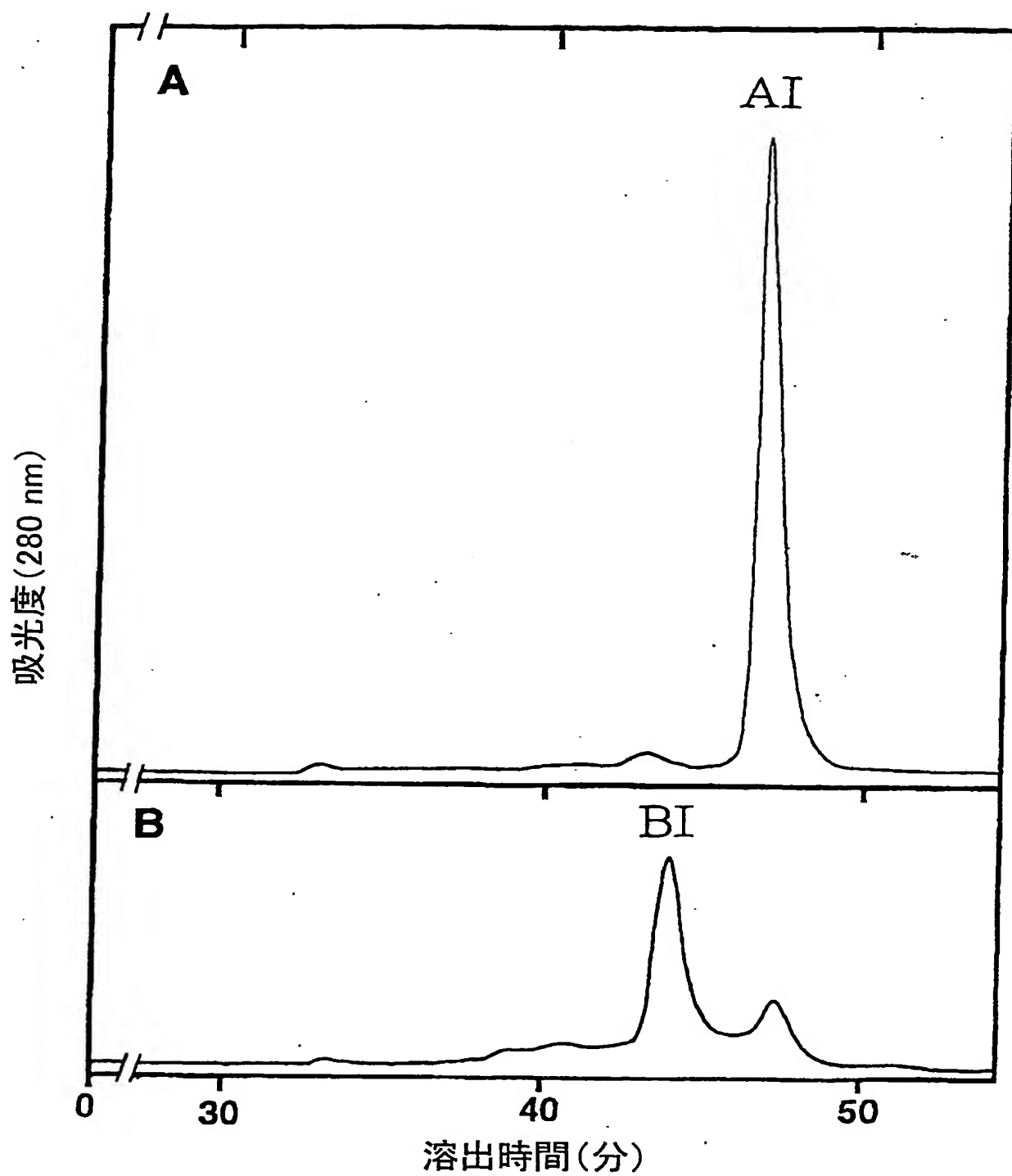


図 2 1

MABL2-scFvのSDS-PAGE分析

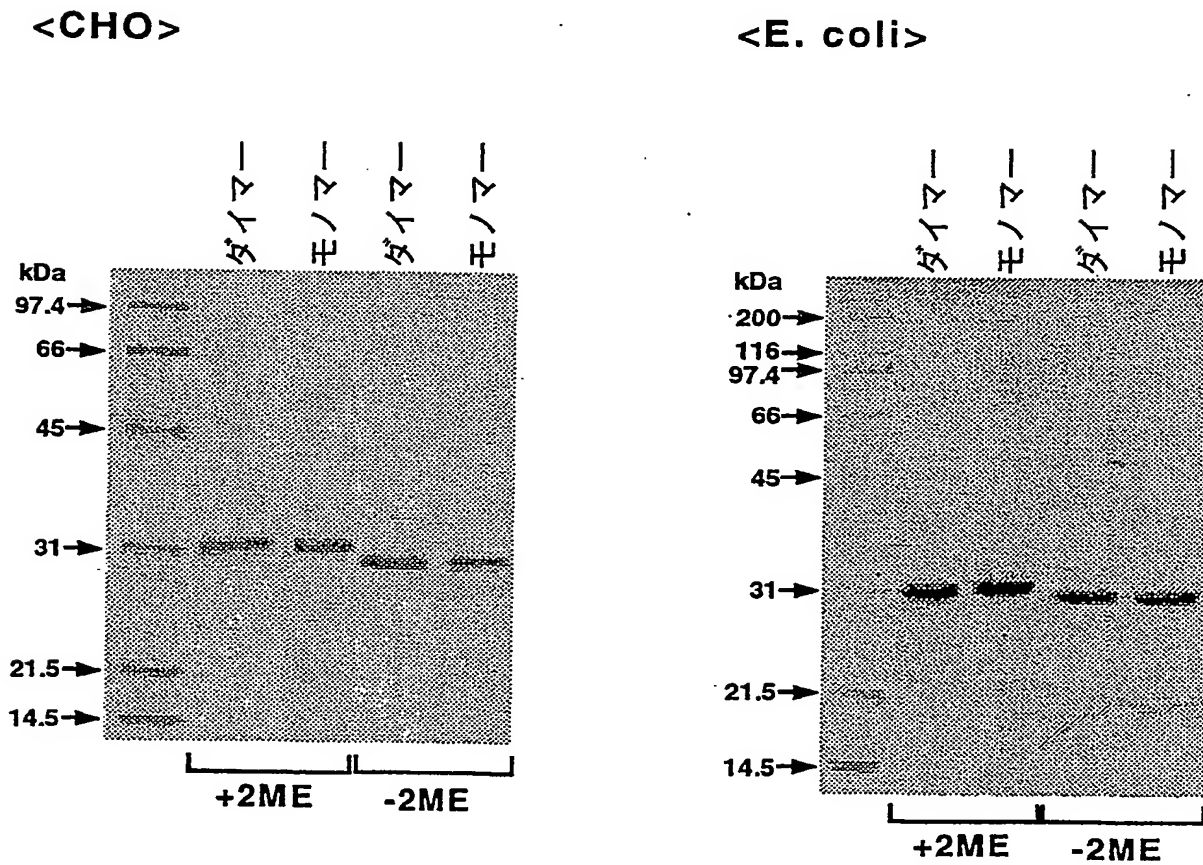


図 2 2

16/43

TSK gel G3000SW

20 mM 酢酸緩衝液, 0.15 M NaCl, pH 6.0

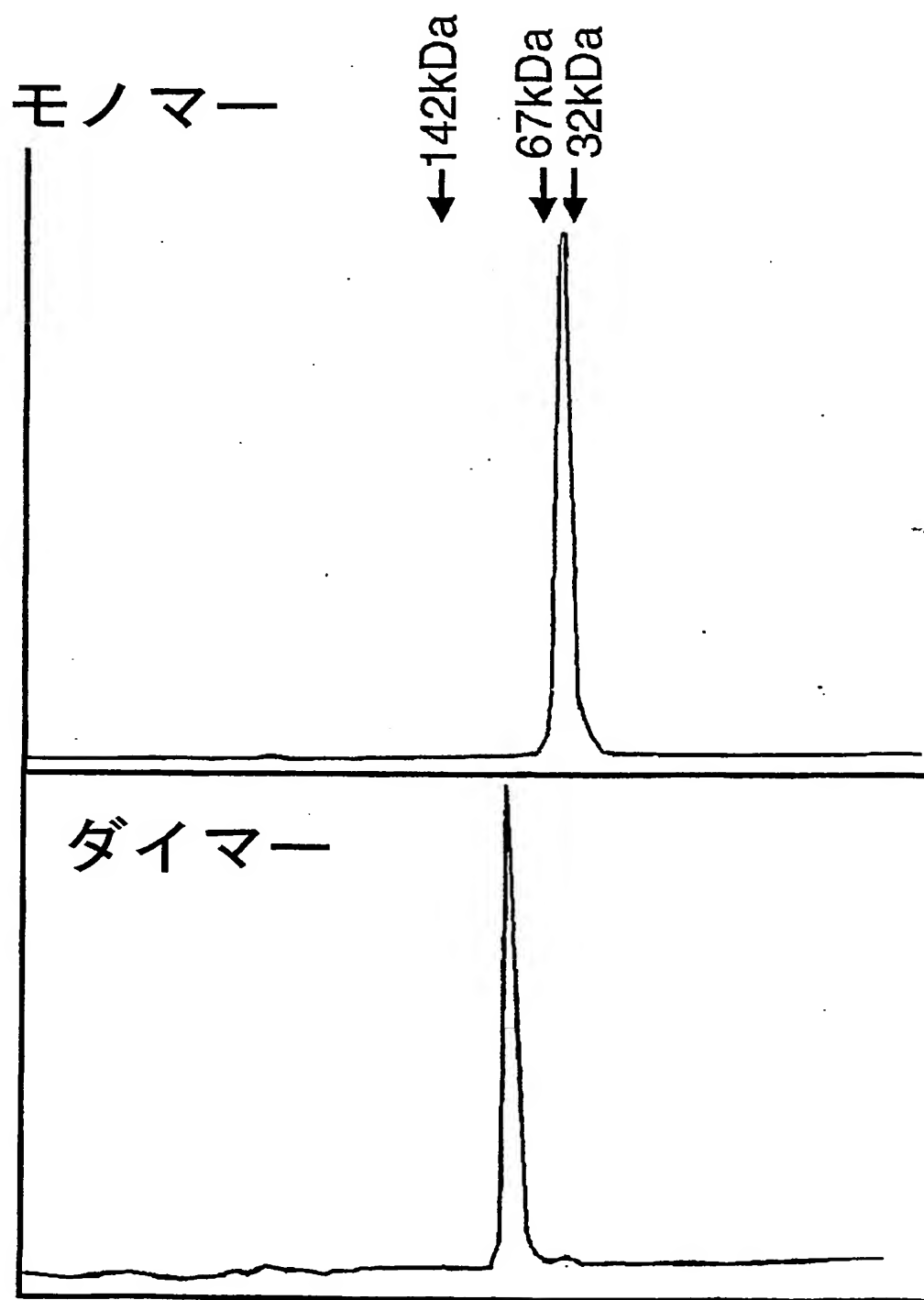


図 2 3

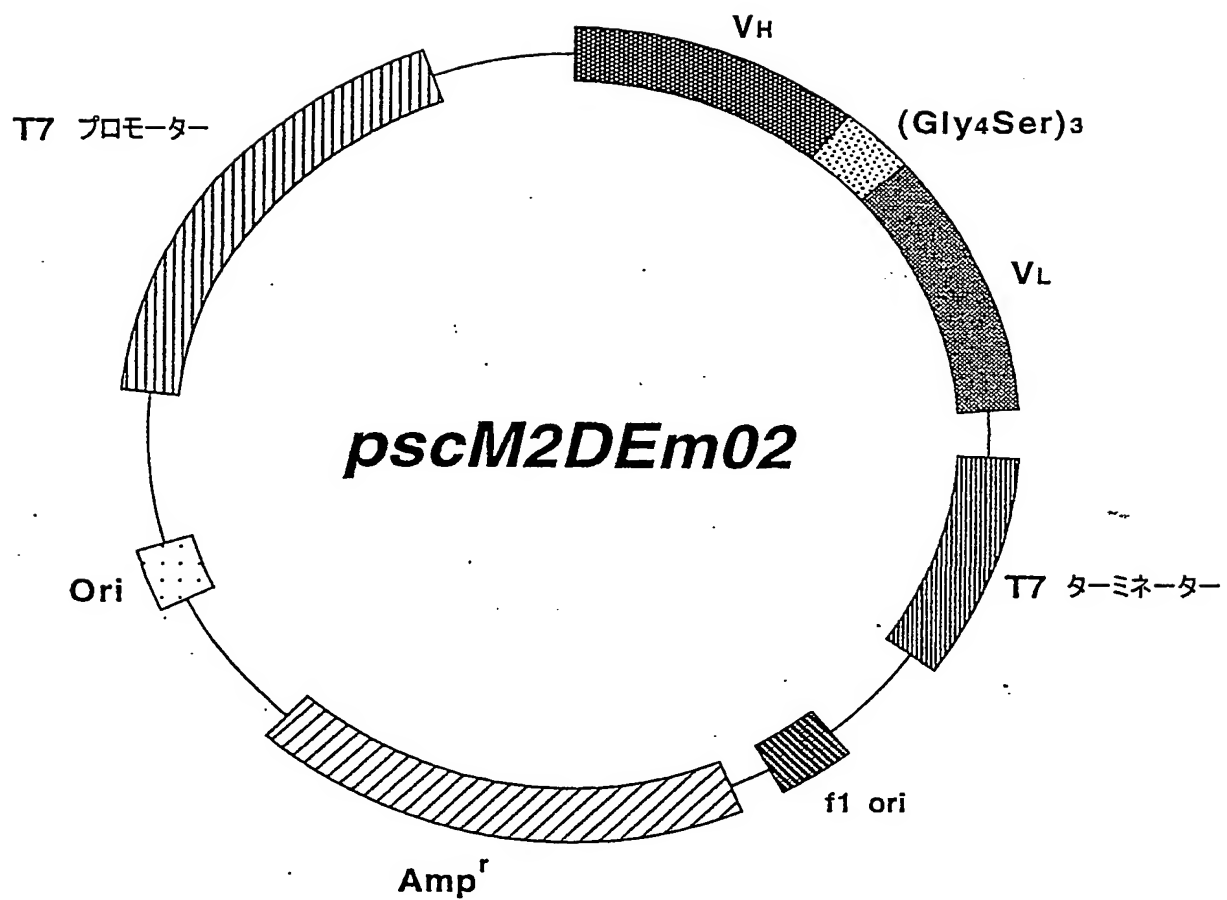
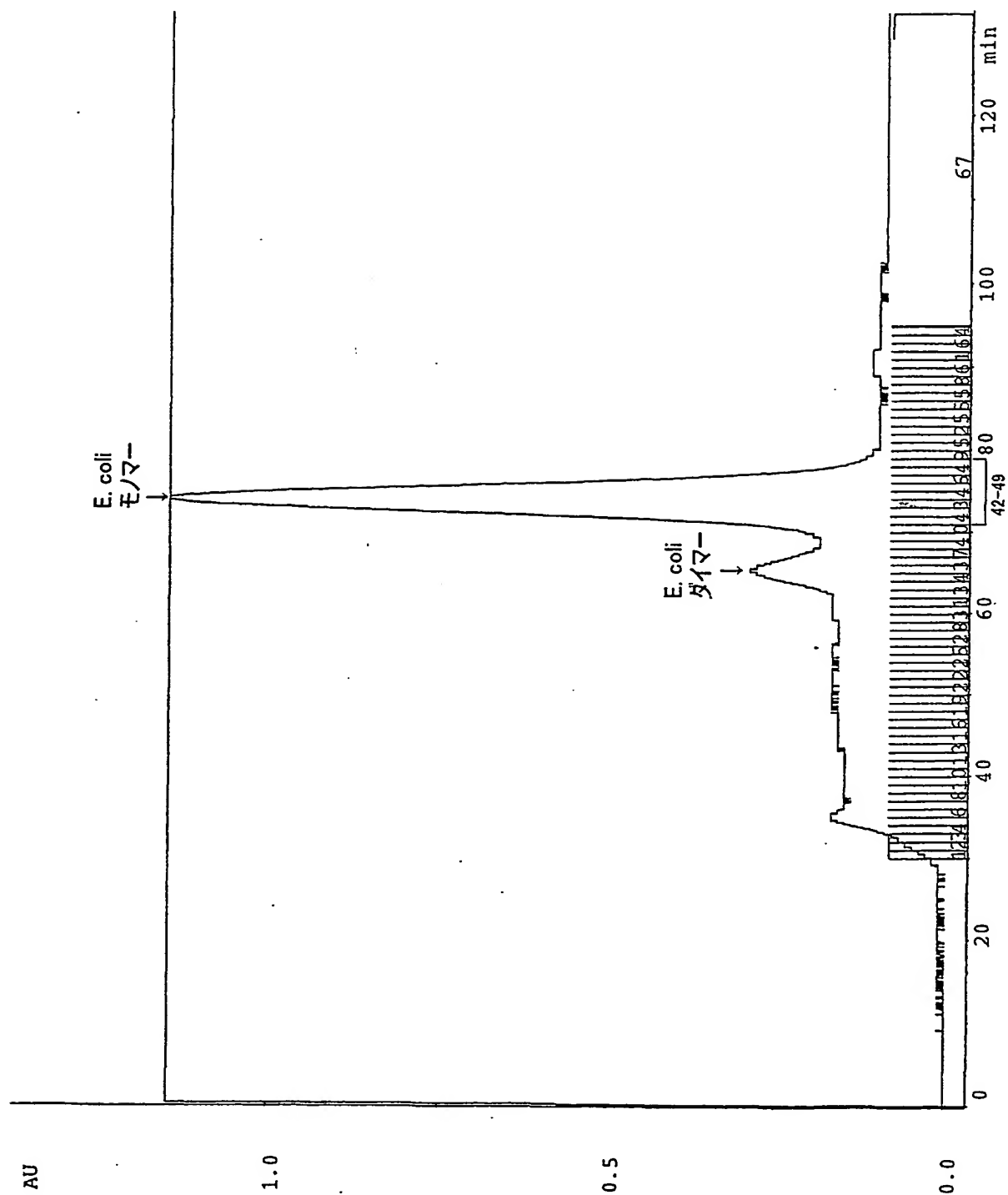
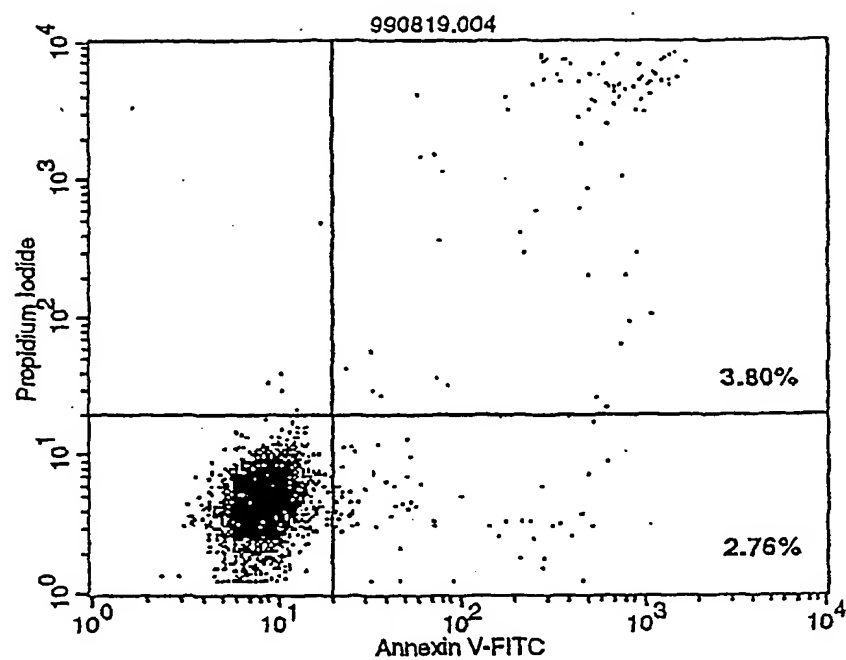


图 24



19/43

25



26

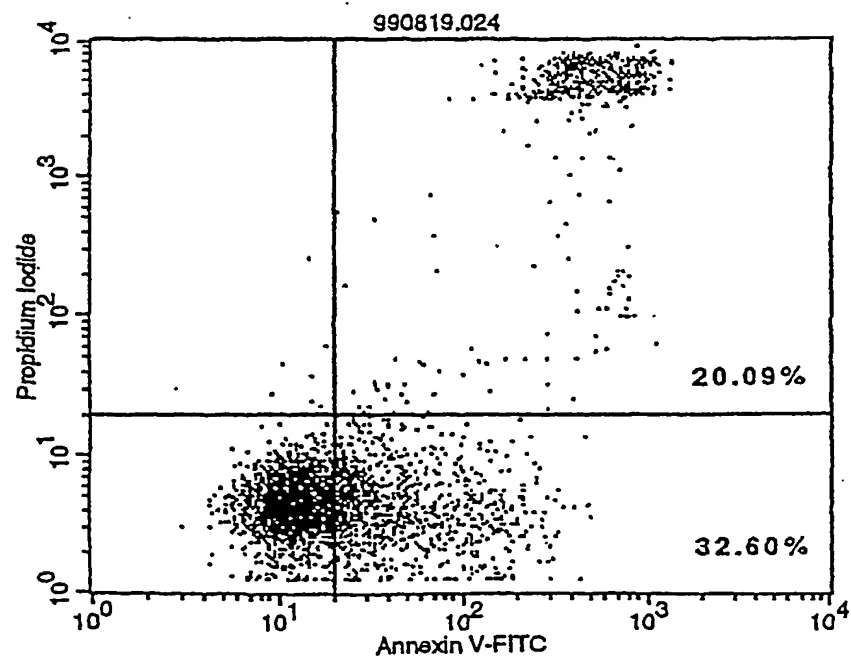


図 27

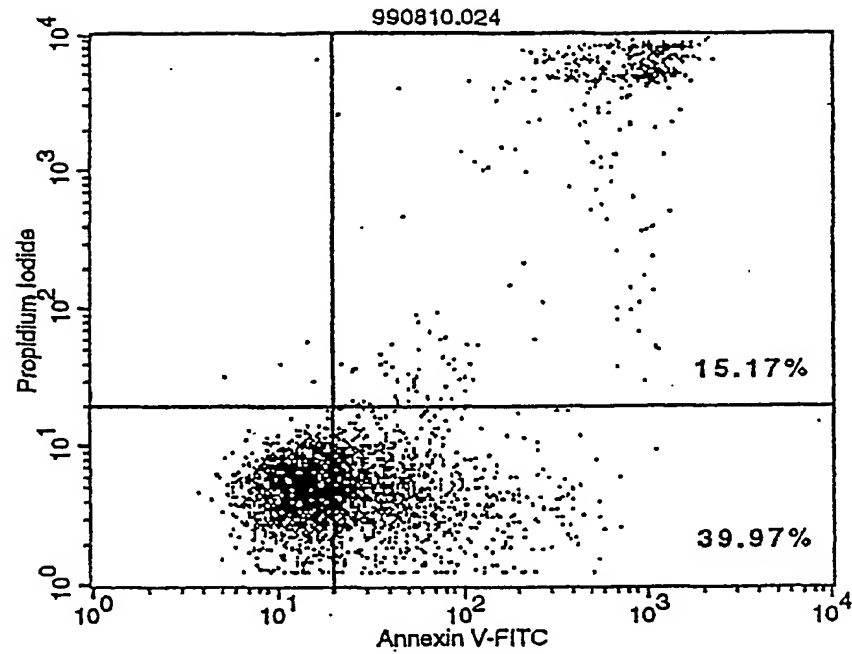
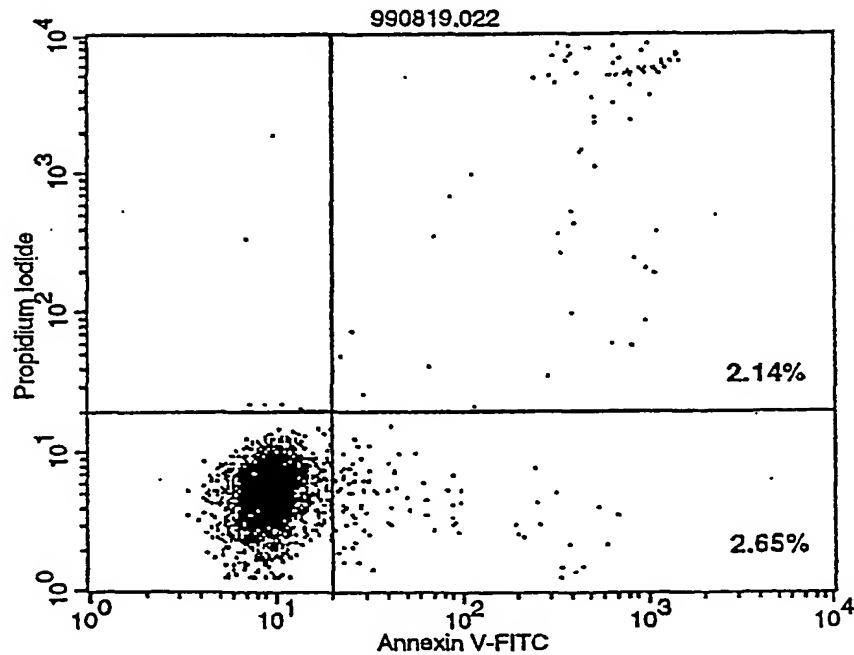
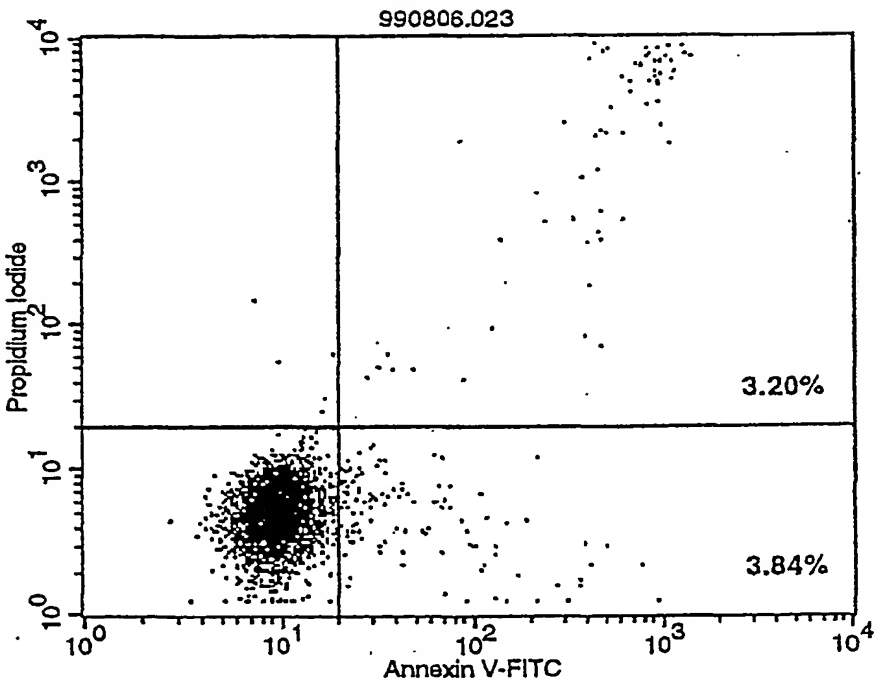


図 28

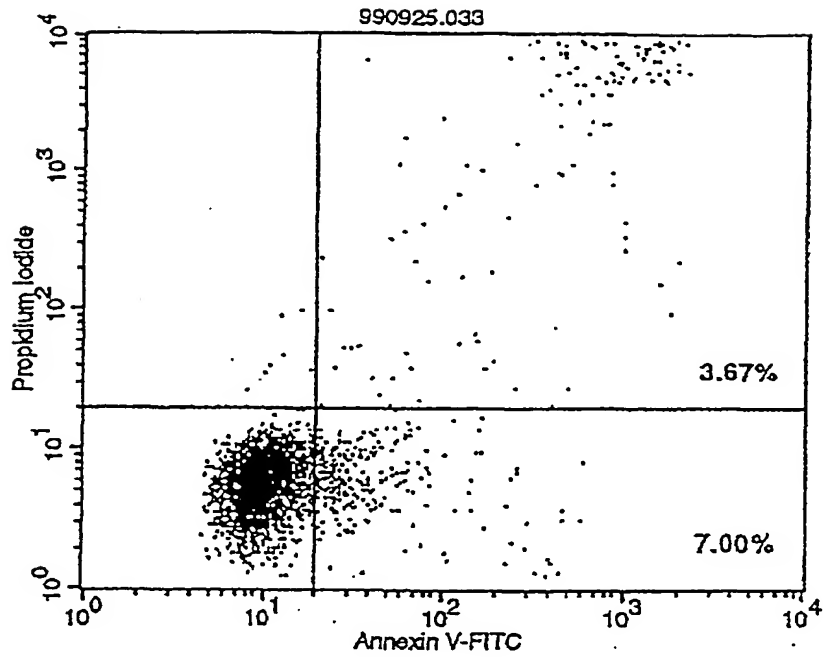


29

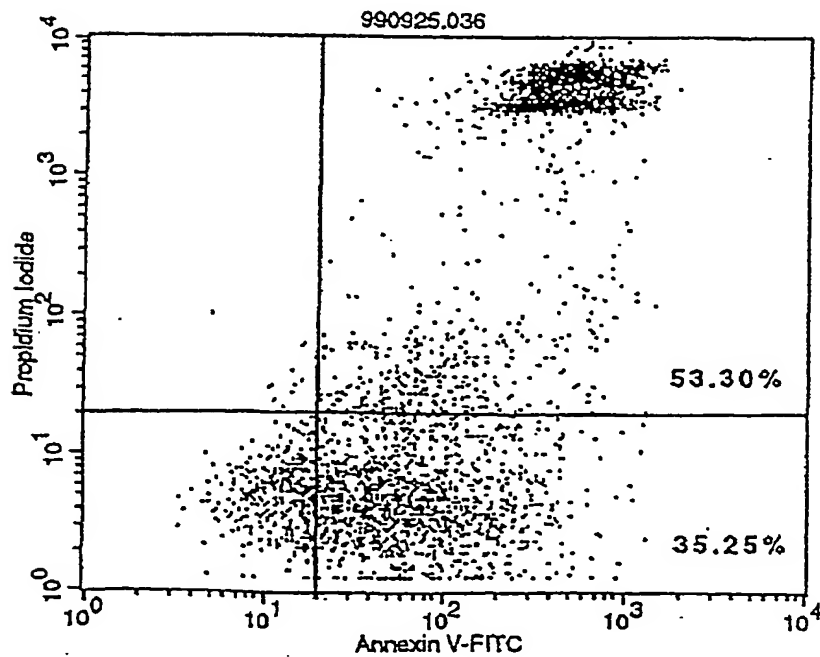


22/43

3 0



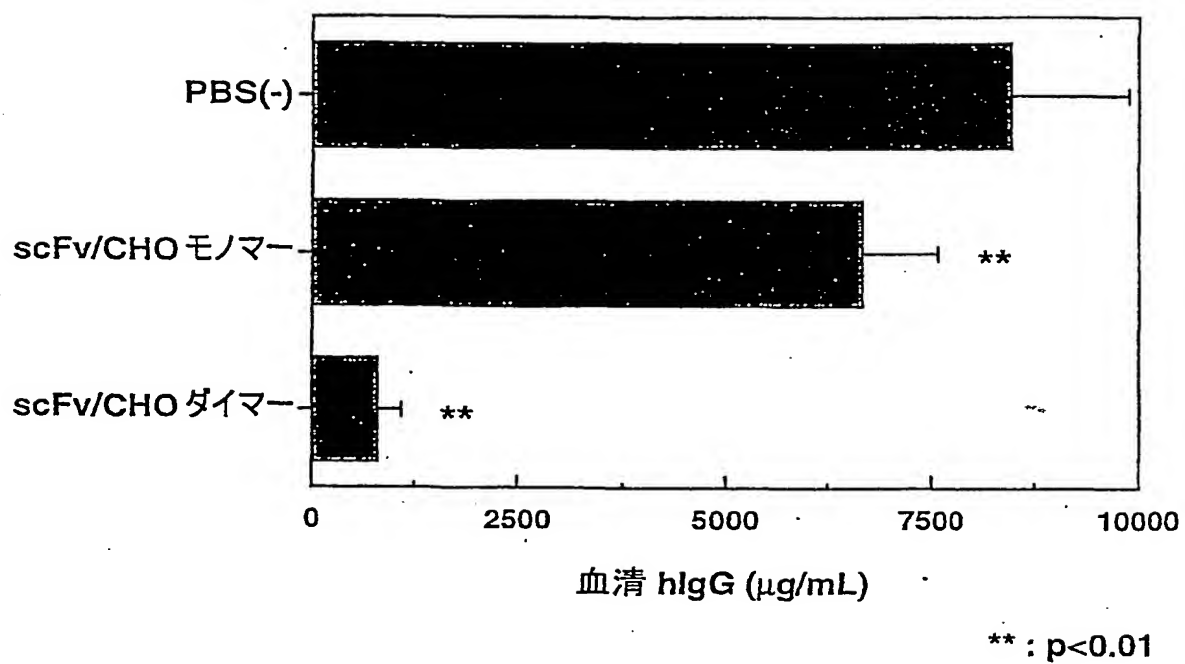
3 1



23/43

図 3 2

KPMM2 i.v. SCIDマウス中の
血清hIgGにおけるMABL-2(scFv)の効果



24/43

図 3 3

KPMM2 i.v. SCIDマウスの
生存におけるMABL-2(scFv)の効果

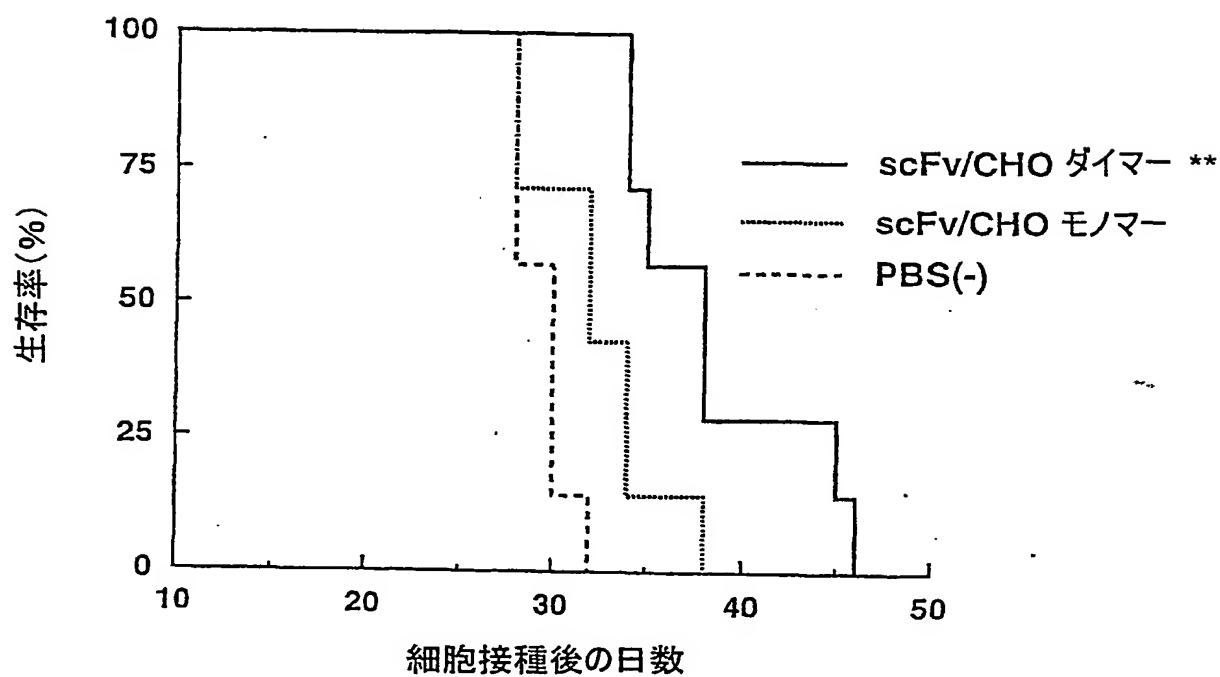
** ; t検定による, $P < 0.01$

図 3 4

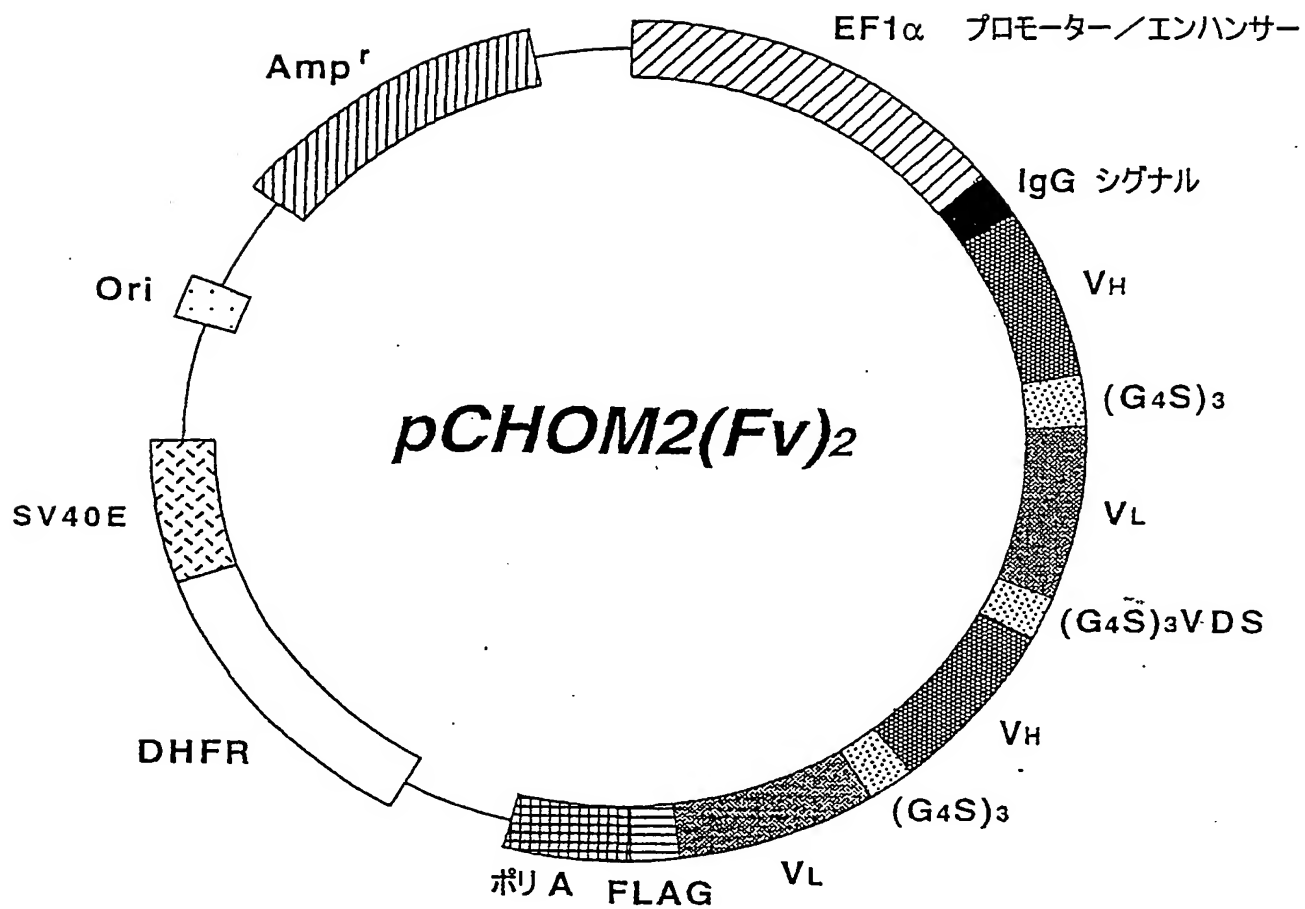


図 35

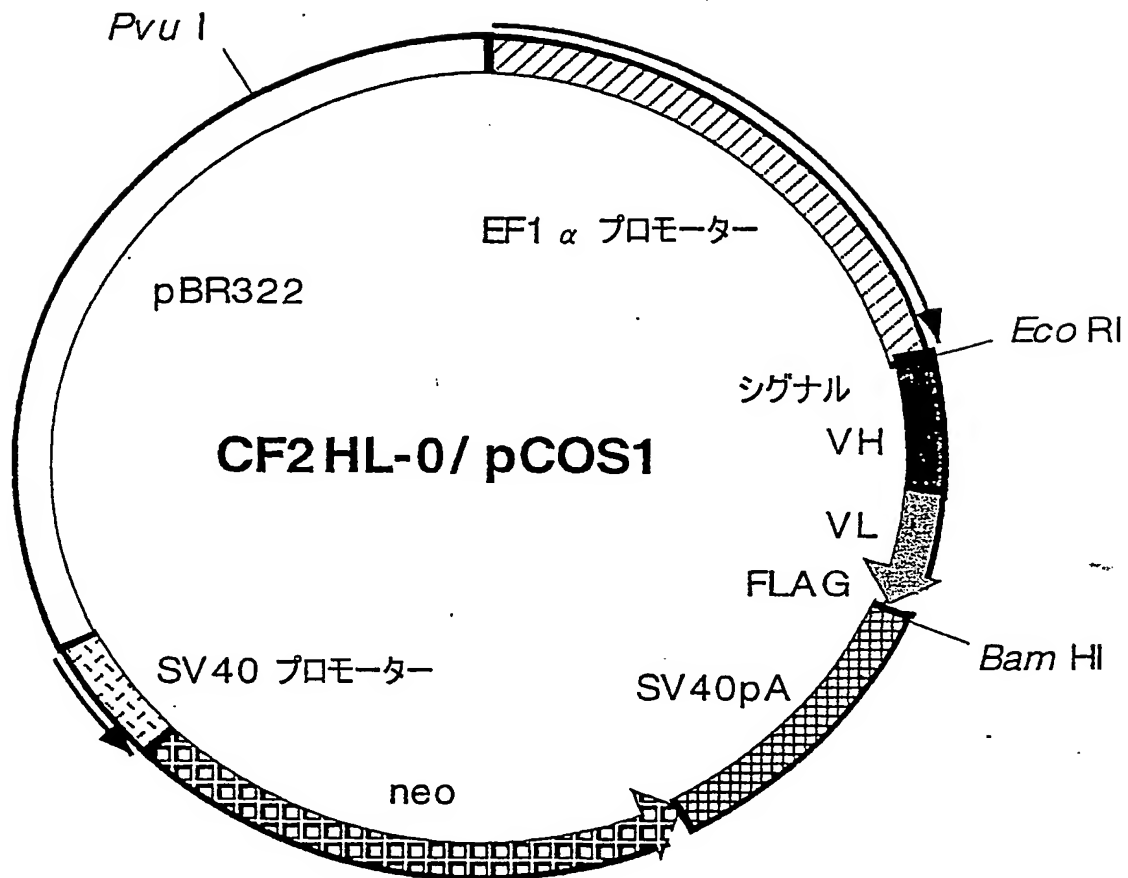
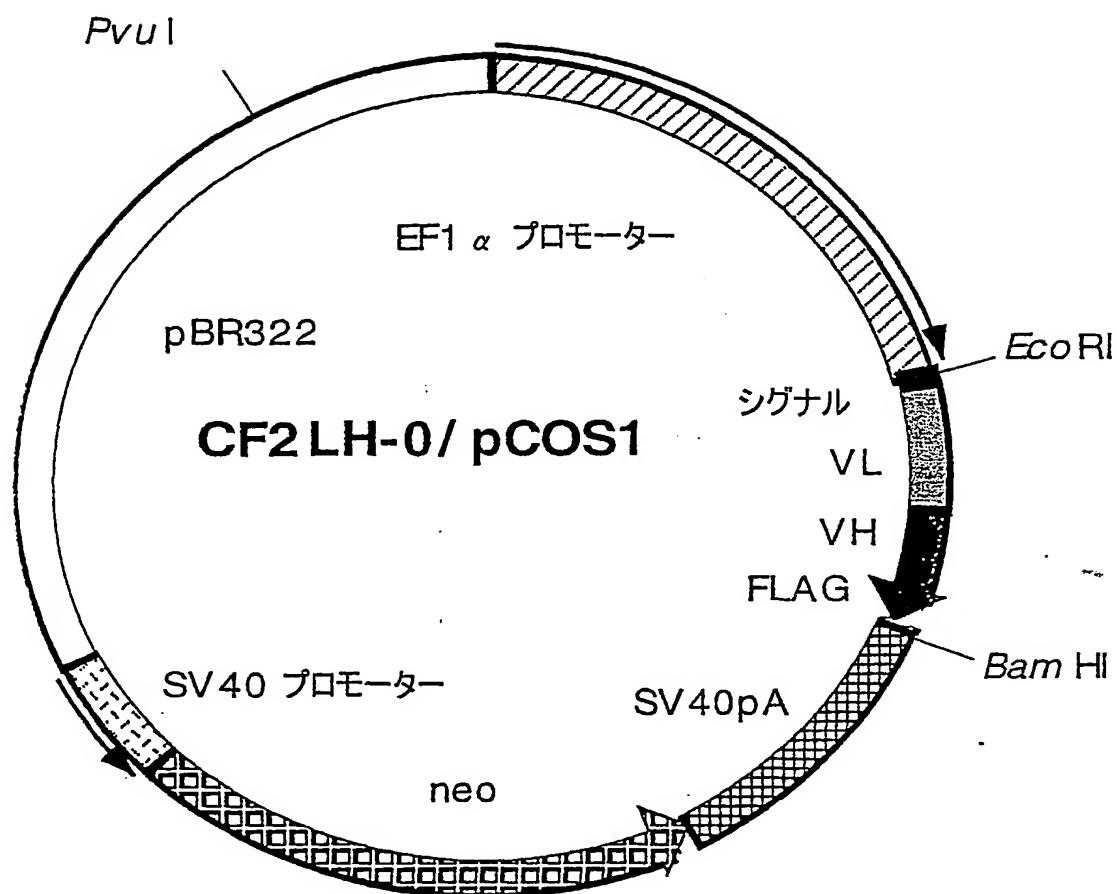


図 3 6

<HLタイプのリンカー塩基配列とアミノ酸配列>

H鎖		リンカー		L鎖		FLAG
... gtc tcg agt				gac gtc gtg ...		
V S S				D V V		
<hr/>						
プラスミド	リンカーアミノ酸の数	リンカー				
CF2HL-0/pCOS1	0	gtc tcg agt				gac gtc gtg
		V S S				D V V
CF2HL-3/pCOS1	3	gtc tcg agt ggt ggt tcc				gac gtc gtg
		V S S G G S				D V V
CF2HL-4/pCOS1	4	gtc tcg agt ggt ggt ggt tcc				gac gtc gtg
		V S S G G G S				D V V
CF2HL-5/pCOS1	5	gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt tcc				gac gtc gtg
		V S S G G G G S				D V V
CF2HL-6/pCOS1	6	gtc tcg agt gt ggt ggt ggt ggt tcc				gac gtc gtg
		V S S G G G G G S				D V V
CF2HL-7/pCOS1	7	gtc tcg agt ggt ggt ggt ggt ggt tcc				gac gtc gtg
		V S S G G G G G G S				D V V

図 3 7



29/43

図 3 8

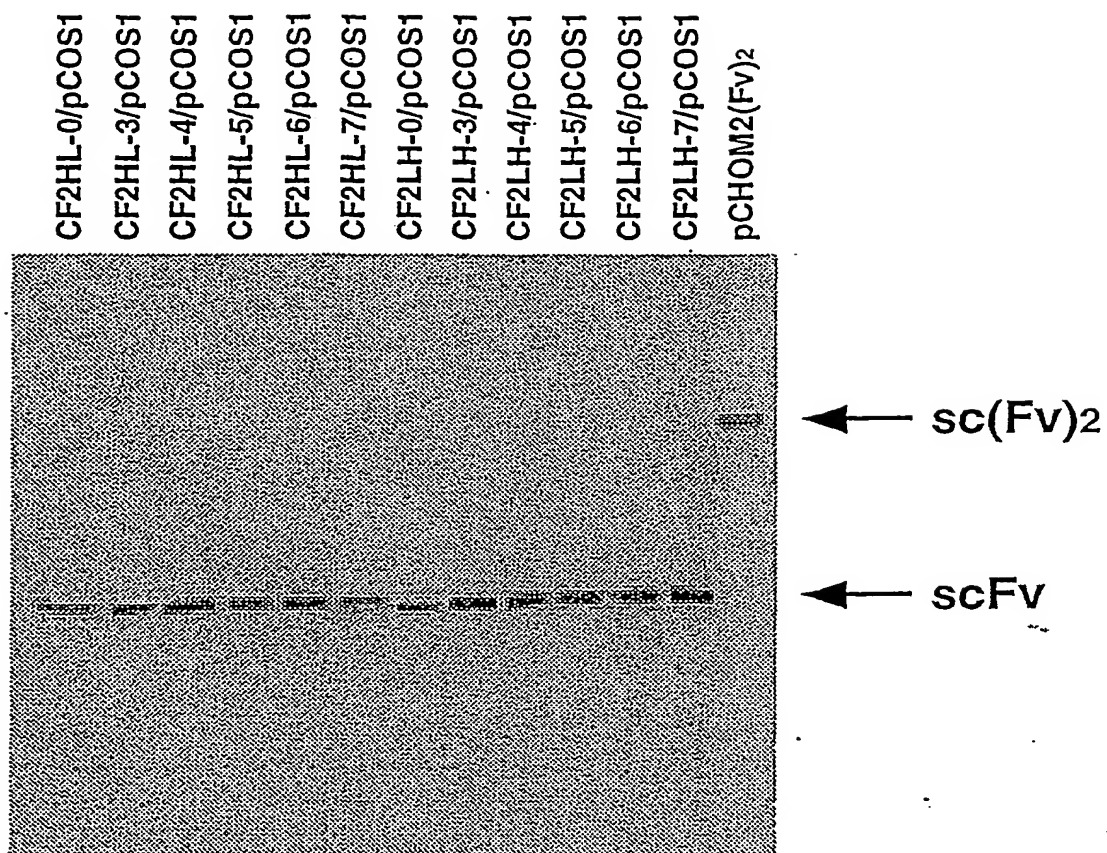
<LHタイプのリンカー塩基配列とアミノ酸配列>

L鎖		H鎖	
... gag ata aaa		リンカー	cag gtc caa ...
E I K			FLAG

プラスミド	リンカーアミノ酸の数	リンカー
CF2LH-0/pCOS1	0	<div>gag ata aaa</div> <div>E I K</div> <div>cag gtc caa</div> <div>Q V Q</div>
CF2LH-3/pCOS1	3	<div>gag ata aaa tcc gga ggc</div> <div>E I K S G G</div> <div>cag gtc caa</div> <div>Q V Q</div>
CF2LH-4/pCOS1	4	<div>gag ata aaa tcc gga ggt ggc</div> <div>E I K S G G G</div> <div>cag gtc caa</div> <div>Q V Q</div>
CF2LH-5/pCOS1	5	<div>gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggc</div> <div>E I K S G G G G</div> <div>cag gtc caa</div> <div>Q V Q</div>
CF2LH-6/pCOS1	6	<div>gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggc</div> <div>E I K S G G G G G</div> <div>cag gtc caa</div> <div>Q V Q</div>
CF2LH-7/pCOS1	7	<div>gag ata aaa tcc gga ggt ggt ggt ggt ggc</div> <div>E I K S G G G G G G</div> <div>cag gtc caa</div> <div>Q V Q</div>

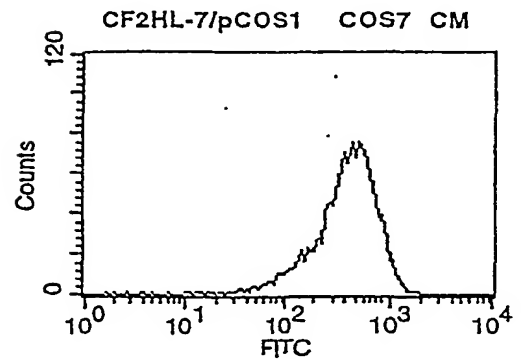
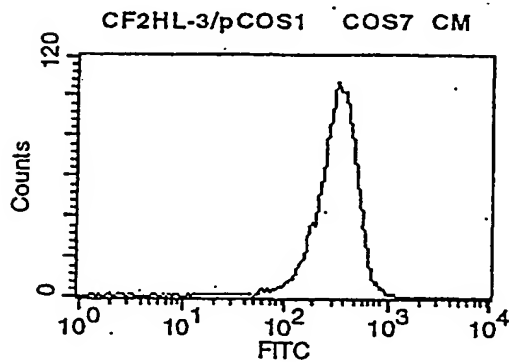
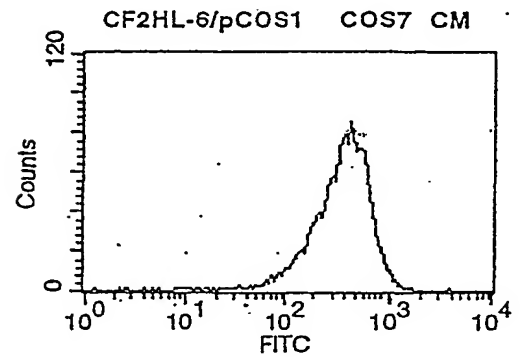
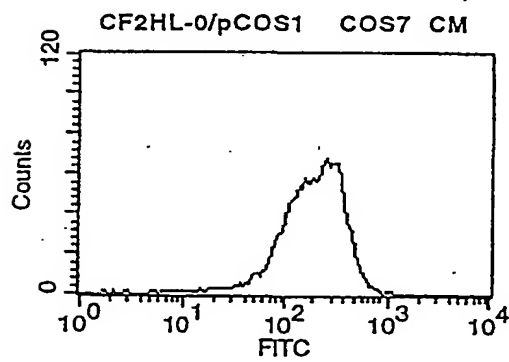
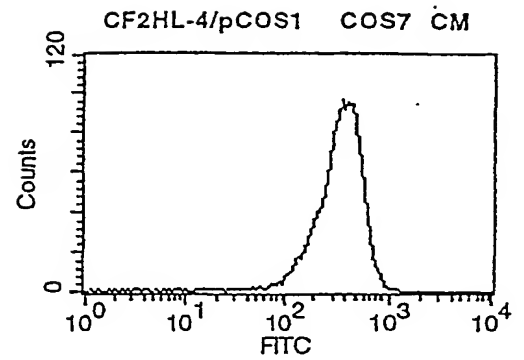
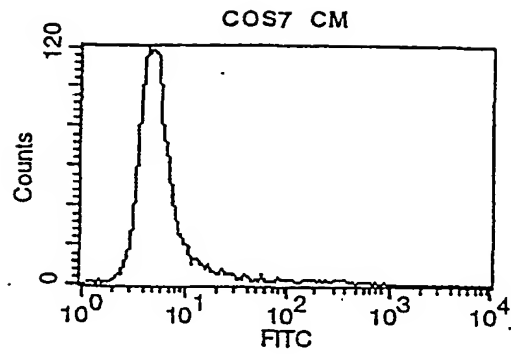
30/43

39



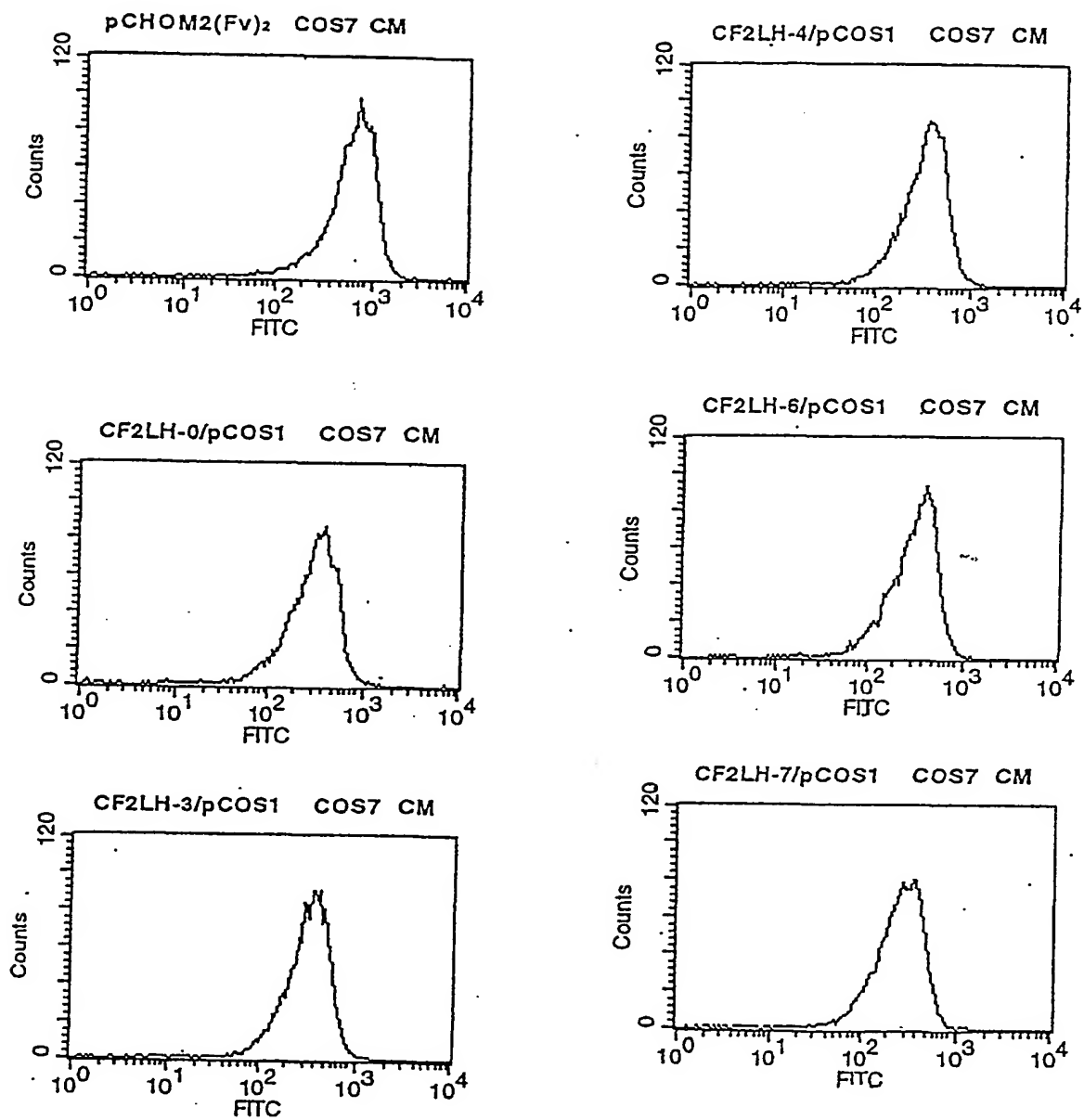
31/43

☒ 40 a



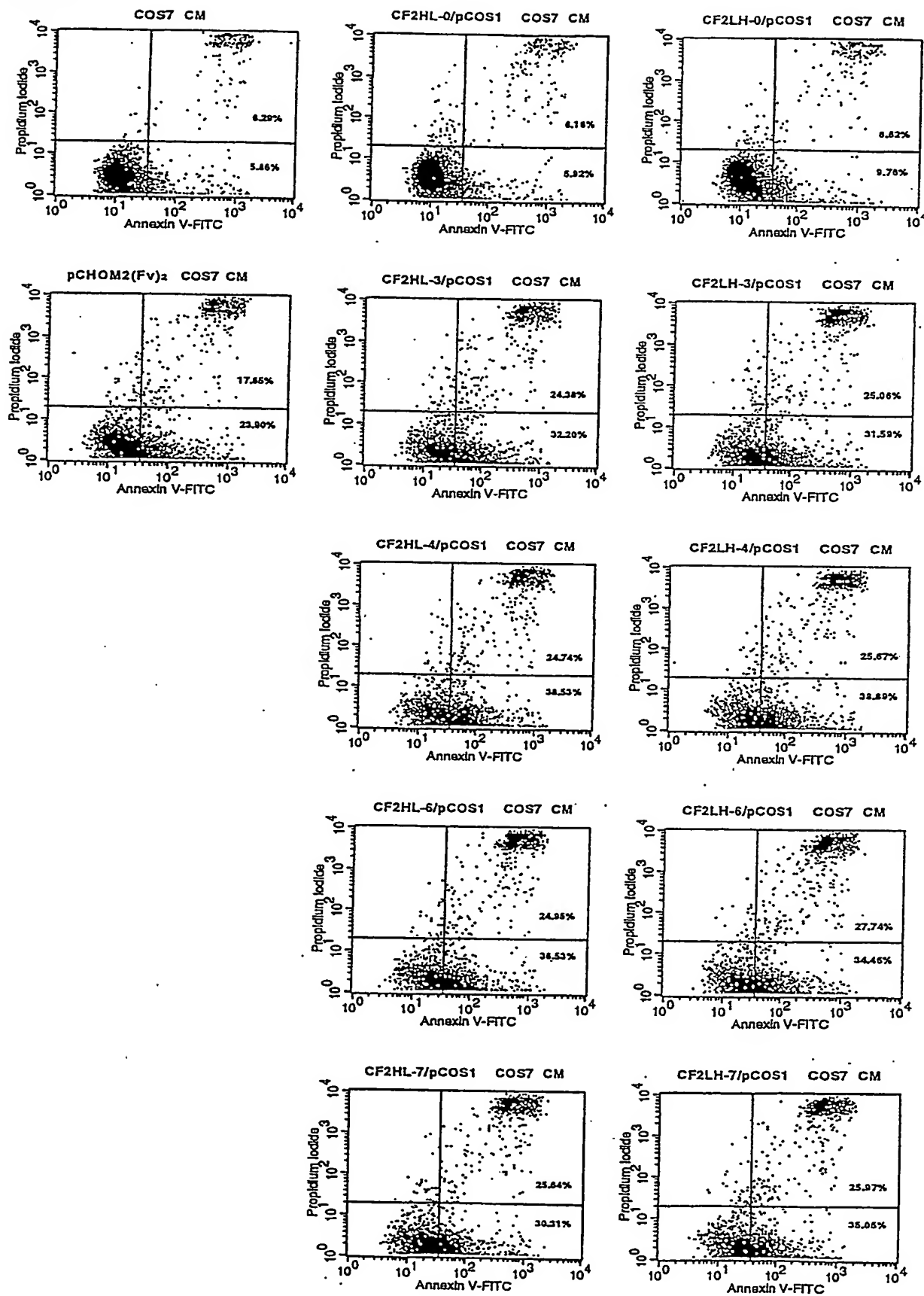
32/43

图 40 b



41

33/43



34/43

図 4 2

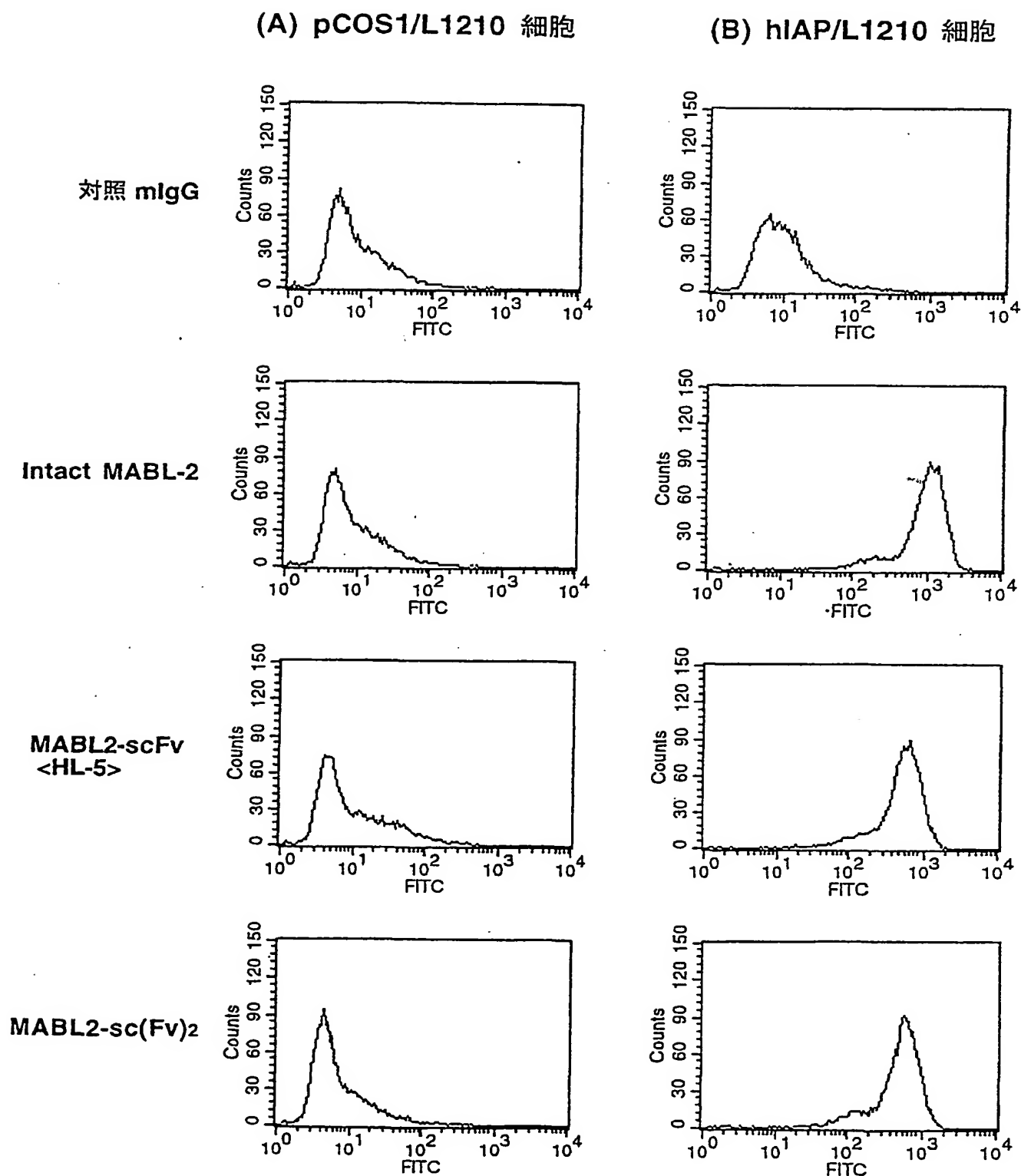
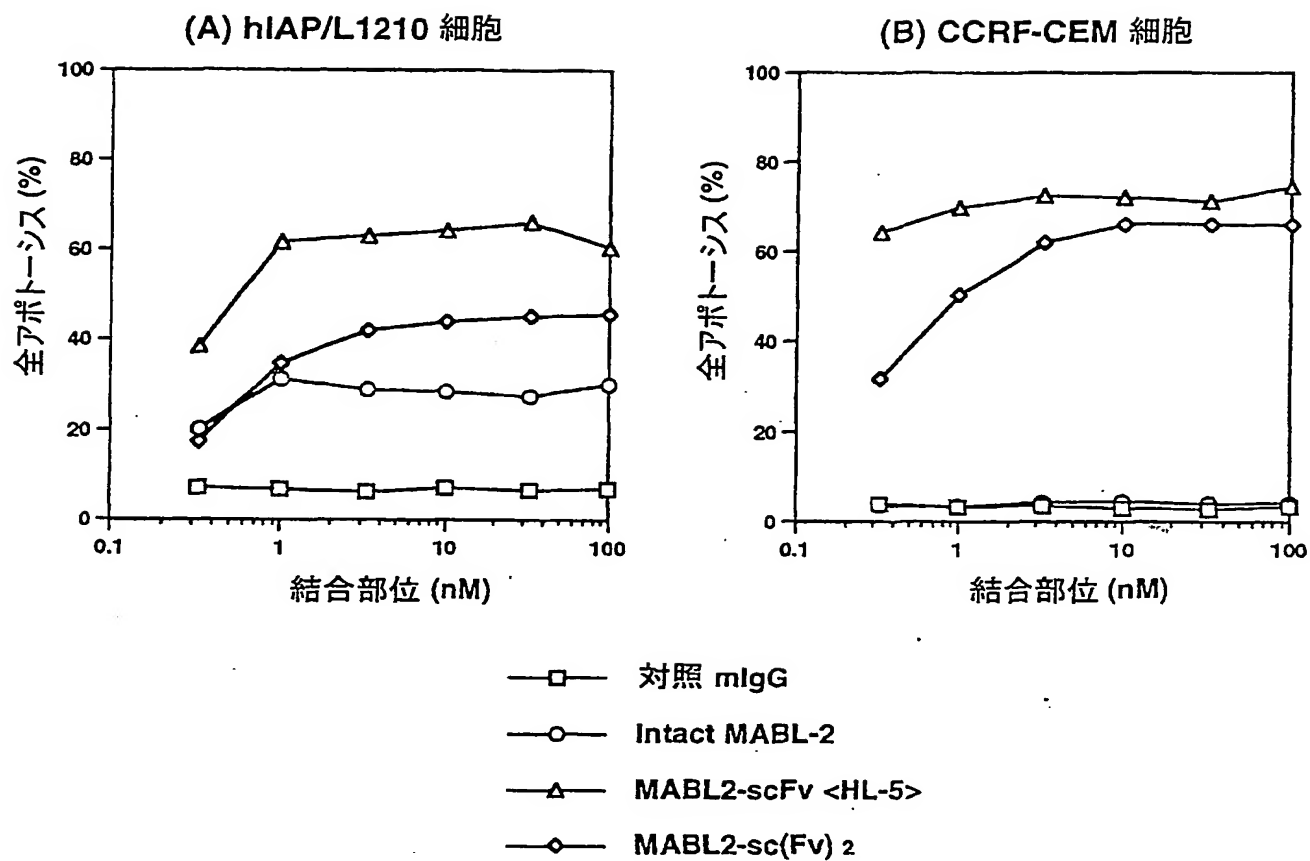
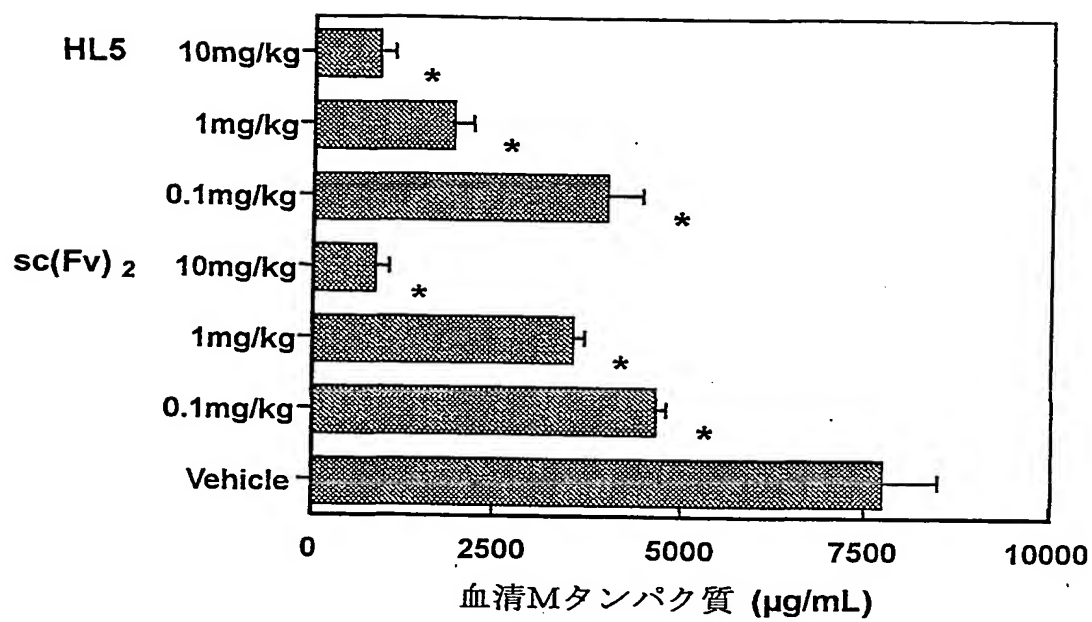


図 4 3



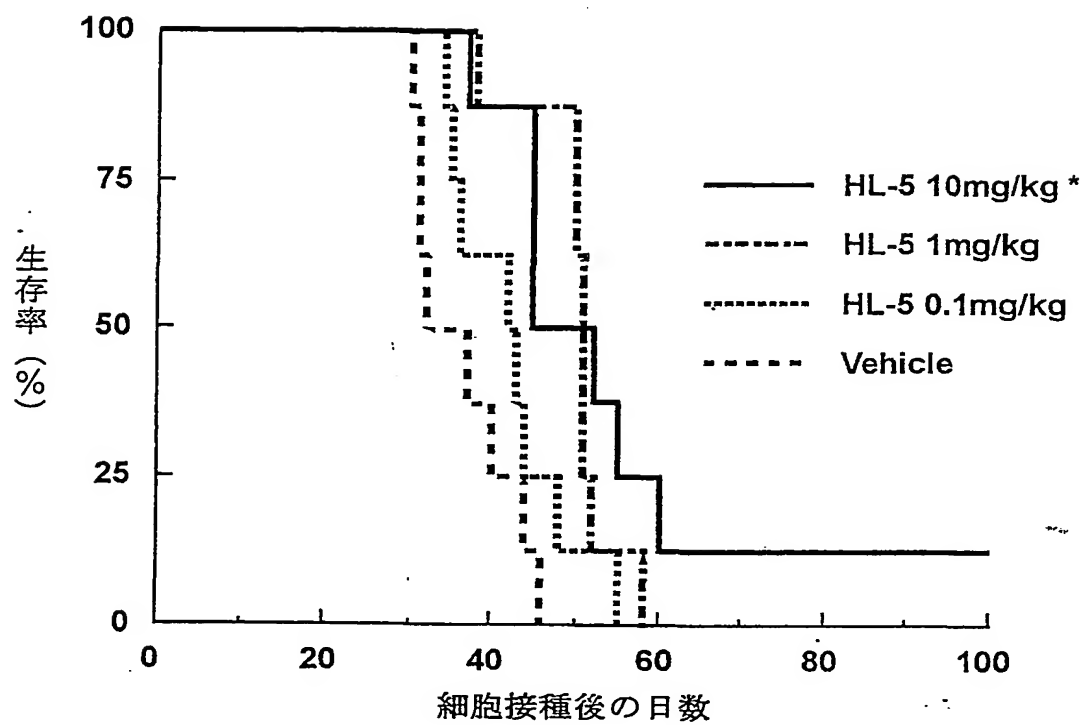
36/43

図 4 4



37/43

図 4 5



38/43

図 4 6

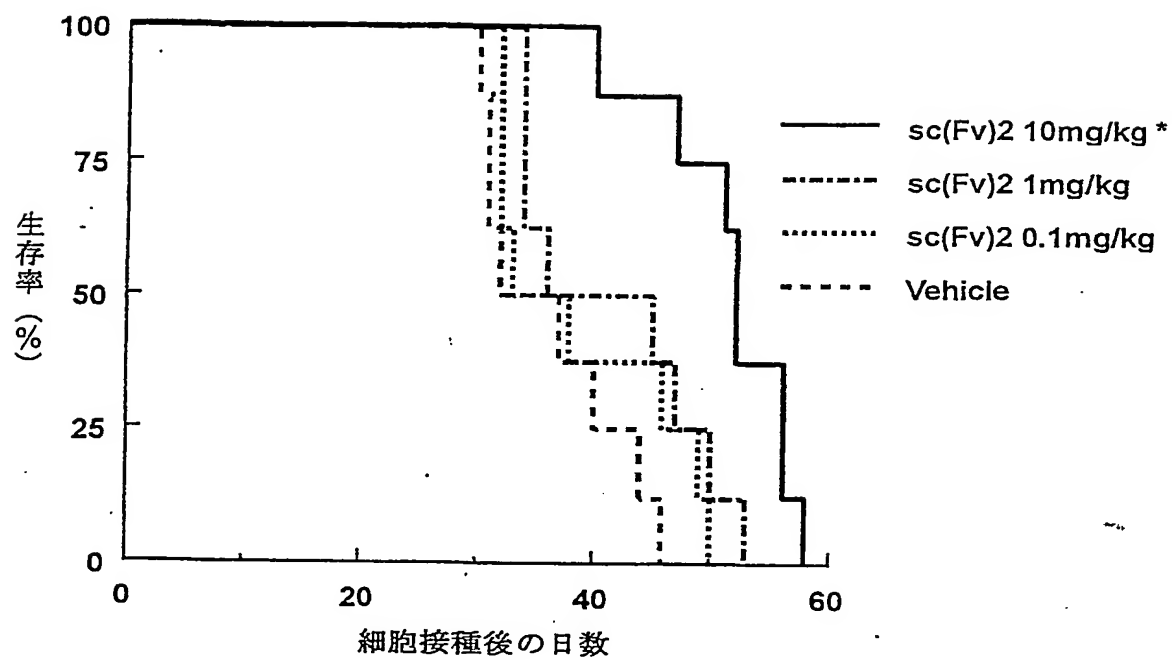
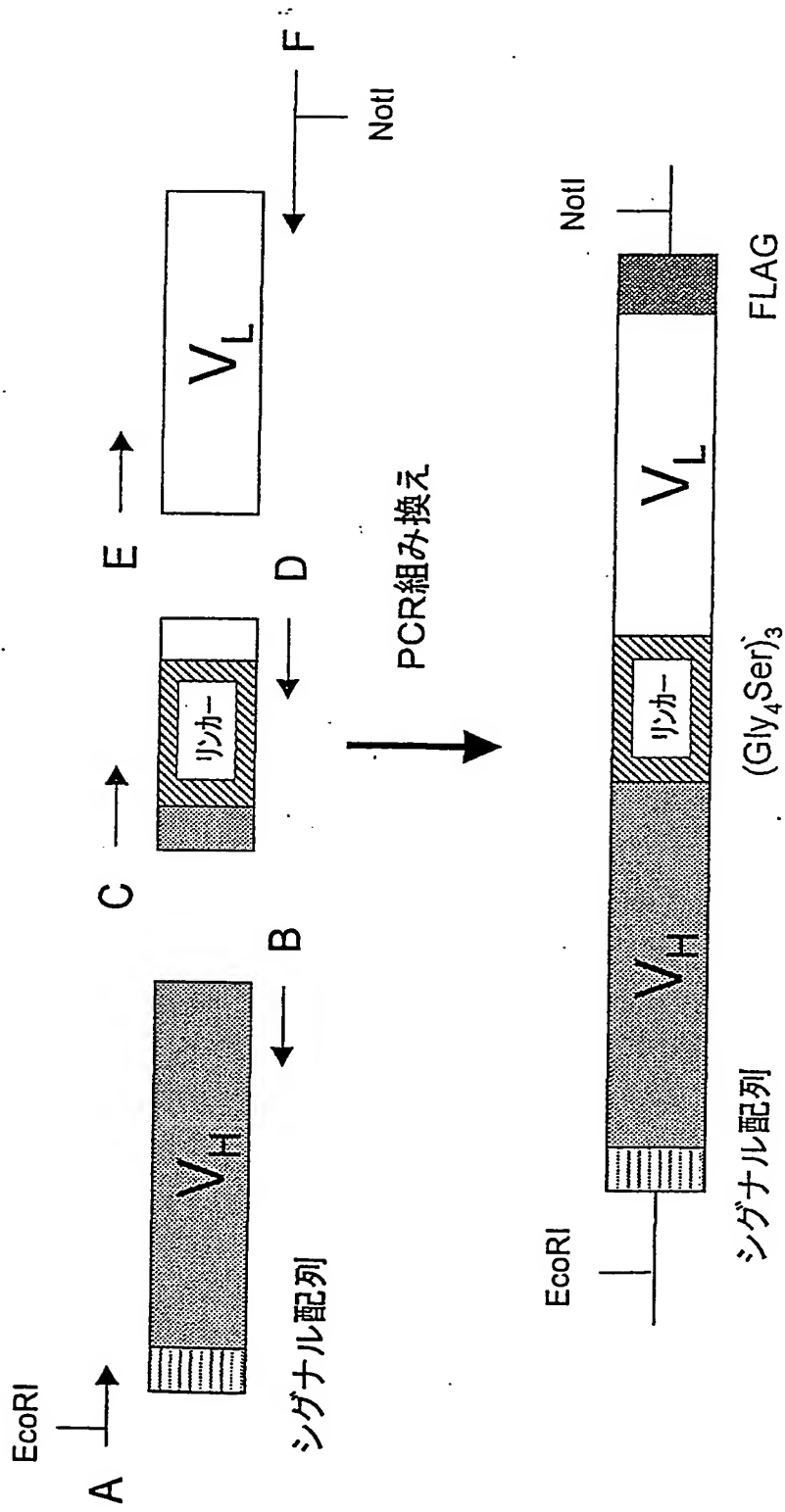


図 4 7



40/43

図 48

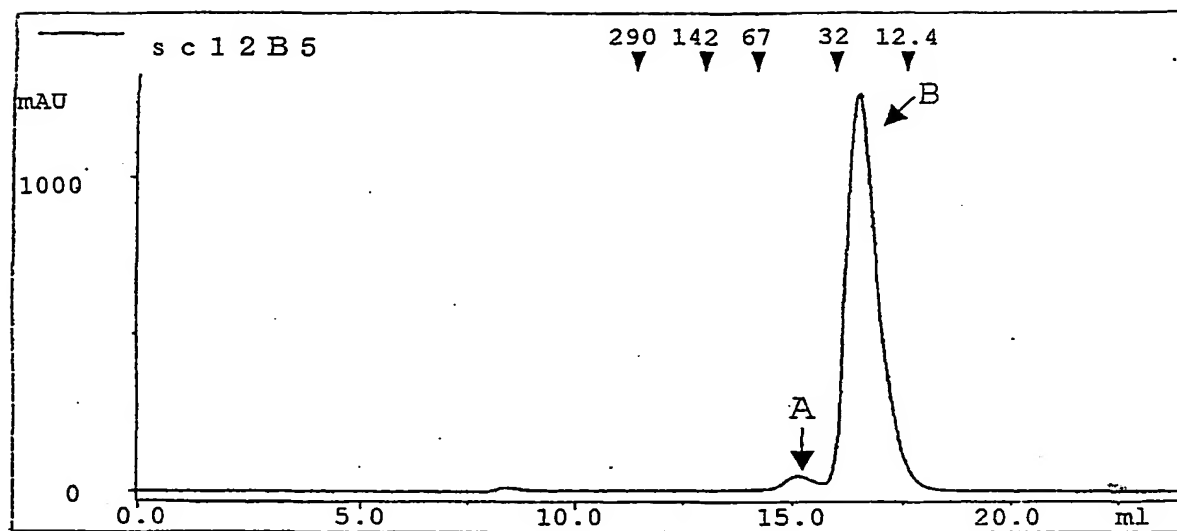


図 4 9

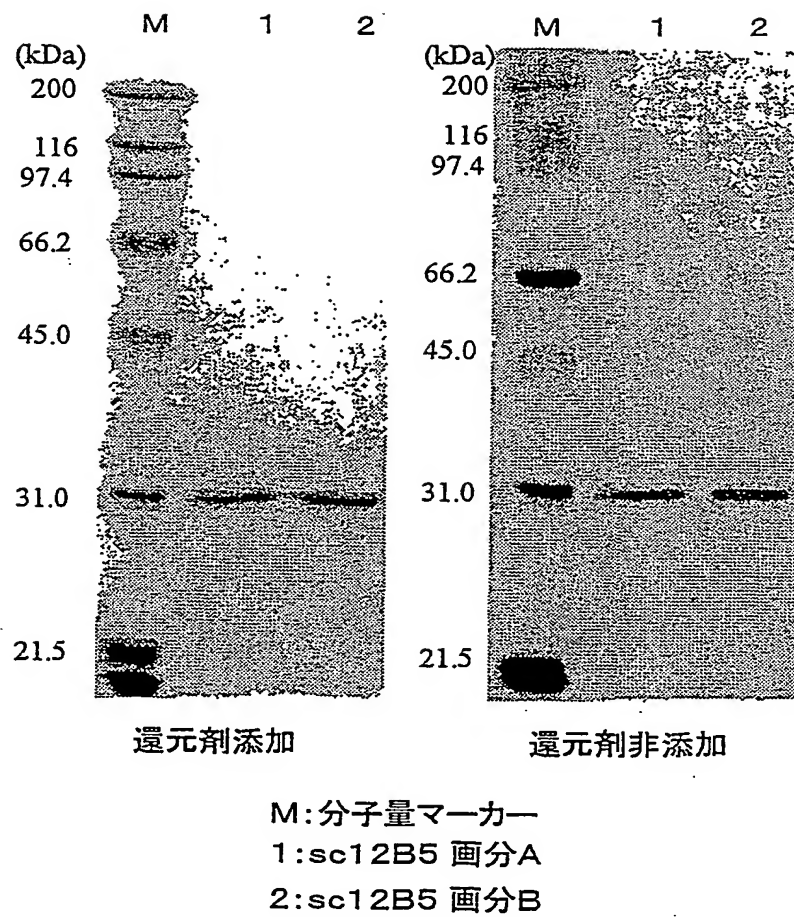
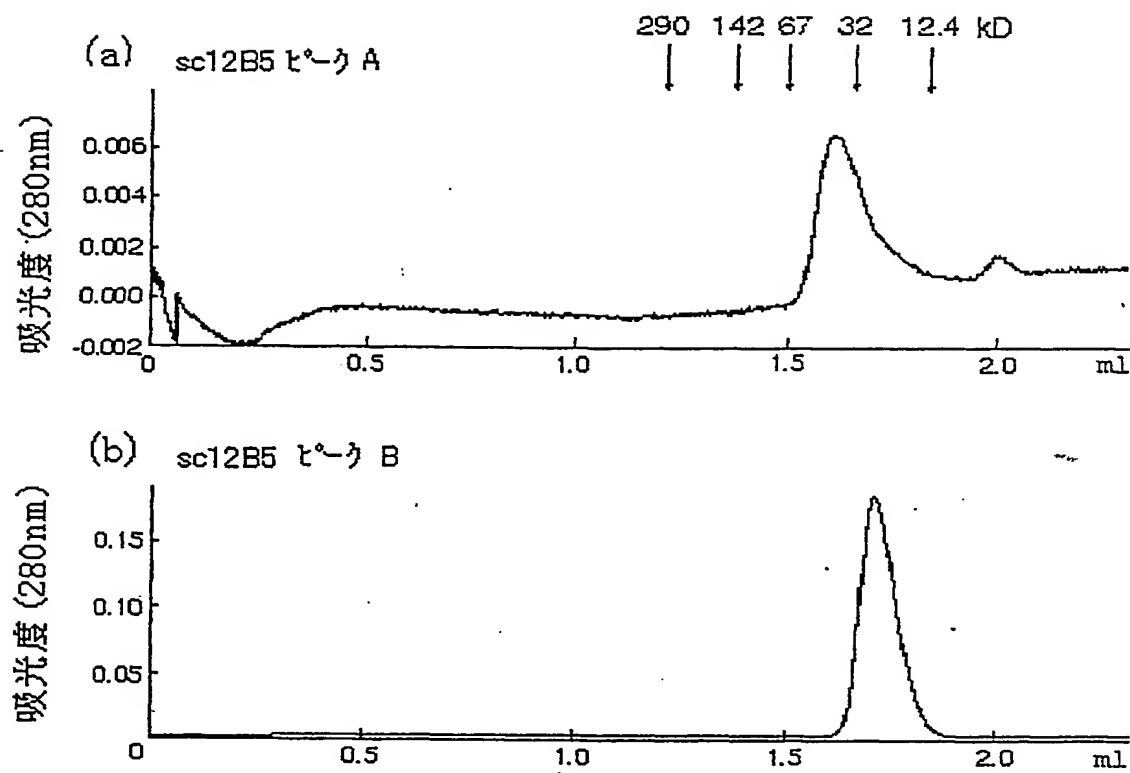


図 50



43/43

図 5 1

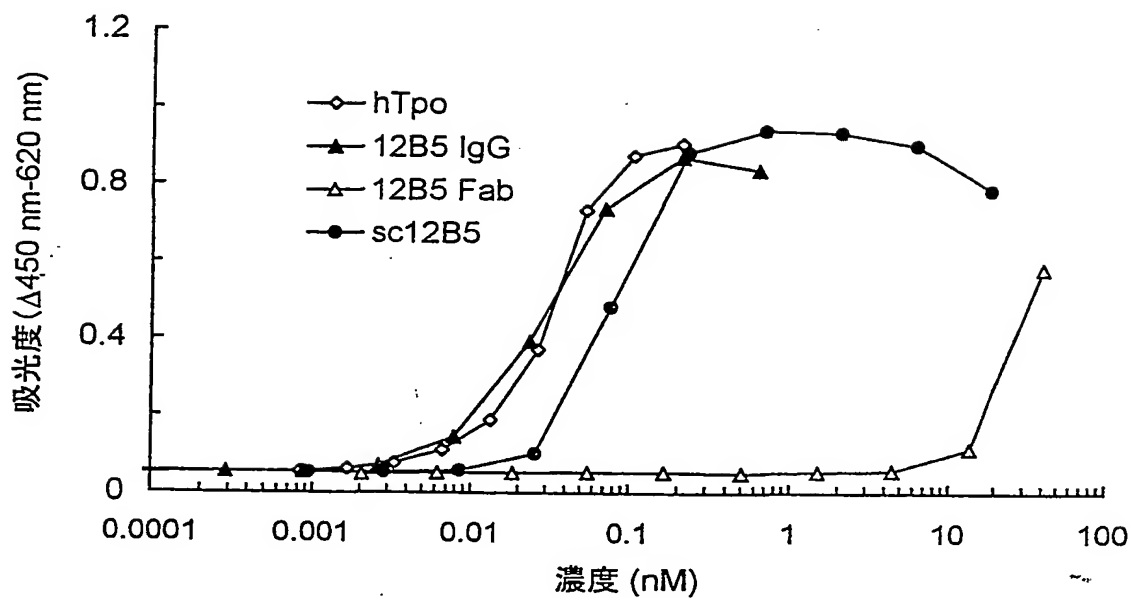
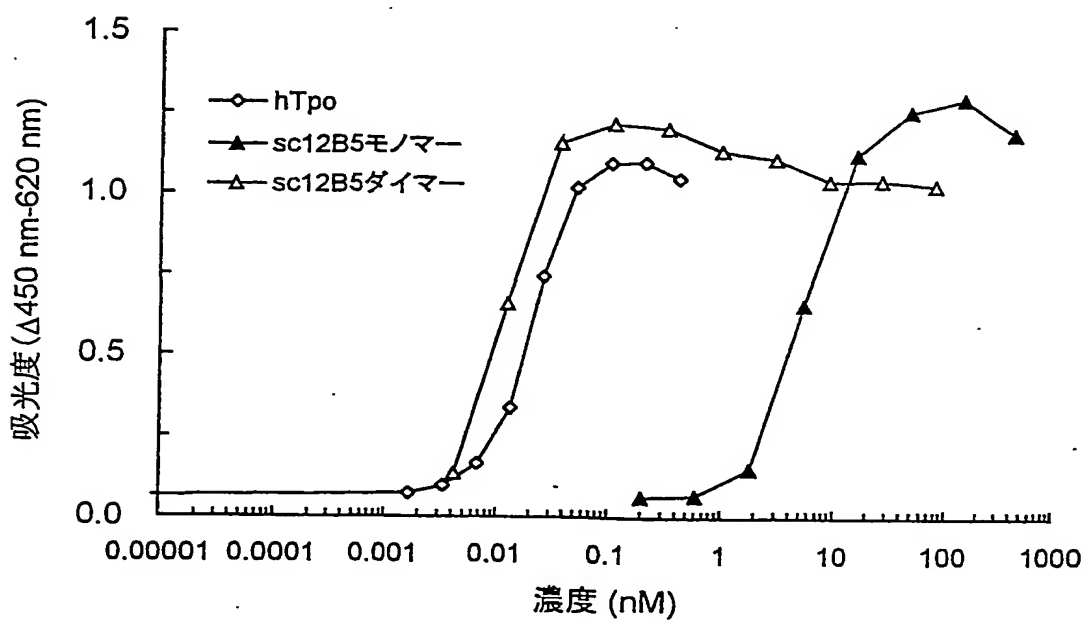


図 5 2



SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Agonist antibody

<130> FP1009

<141> 2001-04-17

<150> JP2000-115246

<151> 2000-04-17

<150> JP2000-321821

<151> 2000-10-20

<150> JP2000-321822

<151> 2000-10-20

<150> PCT/JP01/01912

<151> 2001-03-12

<160> 109

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

ccatcctaatacgaactcactatagggc 27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

ggatcccggg tggatggtgg gaagatg 27

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

ggatcccggg ccagtggata gacagatg 28

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

ggatcccggg agtggataga ccgatg 26

<210> 5

<211> 394

<212> DNA

3/51

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (393)

<223> pGEM-M1L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 5

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro
5 10 15
gcg tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 90
Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
20 25 30
cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 135
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
35 40 45
cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 180
Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr
50 55 60
cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 225
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
65 70 75
tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
80 85 90
tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 315
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
95 100 105
gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360

4/51

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

110

115

120

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

125

130

<210> 6

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

<223> pGEM-M1H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5

10

15

ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

10

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

5/51

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
 65 70 75
 ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 80 85 90
 tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315
 Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 95 100 105
 gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 110 115 120
 tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 tca g 409
 Ser

<210> 7

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (393)

<223> pGEM-M2L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 7

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

6/51

5	10	15	
ggt tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 90			
Gly Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu			
20	25	30	
cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 135			
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser			
35	40	45	
cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 180			
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr			
50	55	60	
ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 225			
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val			
65	70	75	
tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270			
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly .			
80	85	90	
tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 315			
Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu			
95	100	105	
gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360			
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr			
110	115	120	
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394			
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
125	130		

<210> 8

<211> 409

7/51

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (408)

<223> pGEM-M2H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 8

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala
5 10 15
ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90
Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
20 25 30
gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
35 40 45
tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180
Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro
50 55 60
ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
65 70 75
ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270
Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
80 85 90
tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315
Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu
95 100 105

8/51

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

110

115

120

tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405

Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

125

130

135

tca g 409

Ser

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

cccaagcttc caccatgaag ttgcctgtta gg 32

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

cccaagcttc caccatggaa tggagctgga ta 32

<210> 11

9/51

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cgcggtatcca ctcacgtttt atttcagct tggt 34

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

cgcggtatcca ctcacctgag gagactgtga gagt 34

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

catgccatgg cgcaggtcca gctgcagcag 30

<210> 14

<211> 27

10/51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

accaccacct gaggagactg tgagagt 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

gtctcctcag gtggtggtgg ttcgggt 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

cacaacatcc gatccgccac caccgga 27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

11/51

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 17

ggcggatcgg atgttgtgat gacccaa 27

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 18

ccggaattct cattatttat cgtcatcgtc tttgtagtct tttatttcca gcttggt 57

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker amino acid sequence and nucleotide sequence

<400> 19

ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

5

10

15

<210> 20

<211> 828

12/51

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (826)

<223> pscM1. MABL1-scFv

<400> 20

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5

10

15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20

25

30

cct gac ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35

40

45

gct tct gga tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys

50

55

60

cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225

Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro

65

70

75

tac aat gat ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc 270

Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala

80

85

90

aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc 315

Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu

95

100

105

13/51

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga 360
Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
110 115 120

ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405
Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
125 130 135

aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt tcg ggt 450
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
140 145 150

ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 495
Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
155 160 165

cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 540
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
170 175 180

cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 585
Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr
185 190 195

cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 630
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
200 205 210

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
215 220 225

tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 720
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
230 235 240

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765

14/51

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

245

250

255

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

260

265

270

gat gac gat aaa taa tga 828

Asp Asp Asp Lys

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

acgcgtcgac tcccaggtcc agctgcagca g 31

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

gaaggtgtat ccagaagc 18

<210> 23

<211> 819

15/51

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (813)

<223> pCHOM1. MABL1-scFv

<400> 23

```

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
      5              10              15

ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90
Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu
      20              25              30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
      35              40              45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180
Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro
      50              55              60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
      65              70              75

ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270
Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
      80              85              90

tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315
Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
      95              100             105

```

16/51

gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
110 115 120

tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
125 130 135

tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
140 145 150

tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495
Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
155 160 165

ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 540
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
170 175 180

cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac cta cag aag 585
Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys
185 190 195

cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
200 205 210

TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA 675
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
215 220 225

gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
230 235 240

gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga 765

17/51

Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly

245

250

255

ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

260

265

270

aaa taa tga 819

Lys

<210> 24

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (822)

<223> pscM2. MABL2-scFv

<400> 24

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5

10

15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20

25

30

cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35

40

45

gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys

18/51

50	55	60
cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225		
Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro		
65	70	75
tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc 270		
Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala		
80	85	90
act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 315		
Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu		
95	100	105
agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga 360		
Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
110	115	120
ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405		
Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu		
125	130	135
aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt 450		
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
140	145	150
ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 495		
Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu		
155	160	165
cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 540		
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser		
170	175	180
cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 585		
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr		
185	190	195

19/51

ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 630

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

200

205

210

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

215

220

225

tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 720

Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

230

235

240

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

245

250

255

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

260

265

270

gat gac gat aaa taa tga 828

Asp Asp Asp Lys

<210> 25

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (813)

<223> pCHOM2. MABL2-scFv

<400> 25

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

20/51

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
 5 10 15
 ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90
 Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
 20 25 30
 gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
 Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45
 tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180
 Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro
 50 55 60
 ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
 65 70 75
 ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
 80 85 90
 tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315
 Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu
 95 100 105
 gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 110 115 120
 tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

21/51

140	145	150
tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495		
Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser		
155	160	165
ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt. 540		
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu		
170	175	180
gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag 585		
Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys		
185	190	195
cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630		
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg		
200	205	210
ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca 675		
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr		
215	220	225
gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720		
Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly		
230	235	240
gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga 765		
Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly		
245	250	255
ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810		
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp		
260	265	270
aaa taa tga 819		
Lys		

22/51

<210> 26

<211> 456

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (450)

<223> pCHO-shIAP. Soluble human IAP

<400> 26

atg tgg ccc ctg gta gcg gcg ctg ttg ctg ggc tcg gcg tgc tgc 45

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys

5

10

15

gga tca gct cag cta cta ttt aat aaa aca aaa tct gta gaa ttc 90

Gly Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe

20

25

30

acg ttt tgt aat gac act gtc gtc att cca tgc ttt gtt act aat 135

Thr Phe Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn

35

40

45

atg gag gca caa aac act act gaa gta tac gta aag tgg aaa ttt 180

Met Glu Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe

50

55

60

aaa gga aga gat att tac acc ttt gat gga gct cta aac aag tcc 225

Lys Gly Arg Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser

65

70

75

act gtc ccc act gac ttt agt agt gca aaa att gaa gtc tca caa 270

Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln

80

85

90

tta cta aaa gga gat gcc tct ttg aag atg gat aag agt gat gct 315

23/51

Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala

95

100

105

gtc tca cac aca gga aac tac act tgt gaa gta aca gaa tta acc 360

Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr

110

115

120

aga gaa ggt gaa acg atc atc gag cta aaa tat cgt gtt gtt tca 405

Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser

125

130

135

tgg ttt tct cca aat gaa aat gac tac aag gac gac gat gac aag 450

Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

140

145

150

tga tag 456

<210> 27

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 27

ggaattccat atgcaagtc aacttcaaca gtctggacct gaactg 46

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

24/51

<400> 28

ggaattctca ttatttttatt tccagcttgg t 31

<210> 29

<211> 741

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (735)

<223> pscM2DEm02. MABL2-scFv

<400> 29

atg caa gtg caa ctt caa cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct 45

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro

5

10

15

ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 90

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

20

25

30

gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc 135

Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly

35

40

45

ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag 180

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys

50

55

60

tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa 225

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys

65

70

75

tcc tcc acc aca gcc tac atg gac etc agc agc ctg gcc tct gag 270

25/51

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu
 80 85 90
 gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac 315
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr
 95 100 105
 gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt 360
 Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 110 115 120
 ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt 405
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
 125 130 135
 gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 450
 Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp
 140 145 150
 caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 495
 Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 155 160 165
 aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag 540
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 170 175 180
 tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg 585
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
 185 190 195
 gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca 630
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr
 200 205 210
 ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc 675
 Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe

26/51

215 220 225
tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc 720
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
230 235 240
aag ctg gaa ata aaa taa tga 741
Lys Leu Glu Ile Lys

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 30

cagacagtgg ttcaaagt 18

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 31

cgcgtcgacc gatccgccac caccgaacc accaccaccc gaaccaccac caccttttat 60
ttccagcttg gt 72

<210> 32

<211> 1605

27/51

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (1599)

<223> pCHOM2(Fv)2. MABL2-sc(Fv)2

<400> 32

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

5 10 15

ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90

Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu

20 25 30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35 40 45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50 55 60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65 70 75

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr

80 85 90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315

Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu

95 100 105

28/51

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 110 115 120
 tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 140 145 150
 tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495
 Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 155 160 165
 ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt 540
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 170 175 180
 gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag 585
 Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 185 190 195
 cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 200 205 210
 ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca 675
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr
 215 220 225
 gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
 Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 230 235 240
 gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga 765

29/51

Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly
 245 250 255
 ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 810
 Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 260 265 270
 ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gtc gac tcc cag gtc cag ctg 855
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Ser Gln Val Gln Leu
 275 280 285
 cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag 900
 Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
 290 295 300
 atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att 945
 Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile
 305 310 315
 cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 990
 His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 320 325 330
 tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc 1035
 Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 335 340 345
 aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc 1080
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala
 350 355 360
 tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat 1125
 Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 365 370 375
 tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa 1170
 Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln

30/51

380	385	390
ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 1215		
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
395	400	405
ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt 1260		
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser		
410	415	420
cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 1305		
Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser		
425	430	435
tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat 1350		
Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr		
440	445	450
tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg 1395		
Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu		
455	460	465
atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc 1440		
Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe		
470	475	480
agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga 1485		
Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg		
485	490	495
gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca 1530		
Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr		
500	505	510
cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 1575		
His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
515	520	525

31/51

gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa tga 1605

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

530

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 33

tgaggaattc ccaccatggg atg 23

<210> 34

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 34

cacgacgtca ctcgagactg tgagagtggg gccttgccc 40

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

32/51

<400> 35

agtctcgagt gacgtcgtga tgacccaaag tccactctcc 40

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 36

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt c 31

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 37

cgcgtaatac gactcactat ag 22

<210> 38

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 38

33/51

gcaattggac ctgttttatc tcgagcttgg tccccctcc gaacgt 46

<210> 39

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 39

gctcgagata aaacaggtcc aattgcagca gtctggacct gaact 45

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 40

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt cttttagtgc tgaggagact gtgagagtgg 60

<210> 41

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 41

gactgaattc ccaccatgaa gttgcctgtt ag 32

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 42

cagtctcgag tgggtggttcc gacgtcgtga tgacccaaag 40

<210> 43

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

cagtctcgag tgggtggtggt tccgacgtcg tgatgaccca aag 43

<210> 44

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 44

cagtctcgag tgggtggtggt gggtccgacg tcgtgatgac ccaaag 46

35/51

<210> 45

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 45

cagtctcgag tggtagtggt ggtggttccg acgtcgtgat gacccaaag 49

<210> 46

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 46

cagtctcgag tggtagtggt ggtggtggtt ccgacgtcgt gatgacccaa ag 52

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 47

ggccgcatgt tgtcacgaat 20

<210> 48

36/51

<211> 780

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (768)

<223> CF2HL-0/pCOS1. MABL2-scFv<HL-0>

<400> 48

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt gtc 51

MET Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val

5

10

15

gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 102

Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

20

25

30

gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat 153

Ala Ser Val Lys MET Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His

35

40

45

50

gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 204

Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

55

60

65

tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac 255

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp

70

75

80

85

aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 306

Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu

90

95

100

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt 357

Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly

37/51

105 110 115
tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcg agt 408
Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
120 125 130 135
gac gtc gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 459
Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp
140 145 150
caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga 510
Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly
155 160 165 170
aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc 561
Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu
175 180 185
ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt 612
Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
190 195 200
ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct 663
Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val Glu Ala
205 210 215 220
gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 714
Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
225 230 235
ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 765
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
240 245 250 255
aaa taa tga gga tcc 780
Lys

38/51

<210> 49

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 49

caagctcgag ataaaatccg gaggccaggt ccaattgcag cagtc 45

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 50

caagctcgag ataaaatccg gaggtggcca ggtccaattg cagcagtc 48

<210> 51

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 51

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg ccaggtccaa ttgcagcagt c 51

<210> 52

39/51

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 52

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggccaggtc caattgcagc agtc 54

<210> 53

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 53

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggcggccag gtccaattgc agcagtc 57

<210> 54

<211> 780

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (768)

<223> CF2LH-0/pCOS1. MABL2-scFv<LH-0>

<400> 54

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt tcc 51

MET Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu MET Phe Trp Ile Pro Gly Ser

40/51

5 10 15
 agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102
 Ser Ser Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 20 25 30
 gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 153
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 35 40 45 50
 aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca 204
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 55 60 65
 aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg 255
 Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
 70 75 80 85
 ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg 306
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val
 90 95 100
 gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg 357
 Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro
 105 110 115
 tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctc gag ata aaa cag gtc caa ttg cag 408
 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Val Gln Leu Gln
 120 125 130 135
 cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc 459
 Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys MET Ser Cys
 140 145 150
 aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag 510
 Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln
 155 160 165 170

41/51

aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 561

Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

175

180

185

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac 612

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp

190

195

200

aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 663

Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp

205

210

215

220

tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg 714

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp

225

230

235

ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gac tac aaa gac gat gac gat 765

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

240

245

250

255

aaa taa tga gga tcc 780

Lys

<210> 55

<211> 351

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (351)

<223> 12B5HV. 1-351 peptide

<400> 55

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cgg ccc ggg ggg tcc ctg agt ctc 60

42/51

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu
 5 10 15 20
 tcc tgt gca gtc tct gga atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct 120
 Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly MET His Trp Val Arg Gln Ala
 25 30 35 40
 cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa tac tat 180
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Tyr
 45 50 55 60
 gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag aac acc ctg tat 240
 Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gga gca 300
 Leu Gln MET Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala
 85 90 95 100
 cat tat ggt ttc gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg agt 351
 His Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr MET Val Thr Val Ser Ser
 105 110 115

<210> 56

<211> 57

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (57)

<223> reader sequence

<400> 56

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt gtc cag tgt 57

MET Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly Val Gln Cys

5

10

15

<210> 57

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-1

<400> 57

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagagggtg ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtccggcccg gggggtcctt gagtc 115

<210> 58

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-2

<400> 58

aaggatatac ctgccacca ctccagcccc ttgcctggag cctggcggac ccagtgcag 60
ccgtaggtcc tgagggtgat tccagagact gcacaggaga gactcaggga ccccc 115

<210> 59

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

44/51

<223> 12B5VH-3

<400> 59

ggcaggtata tcctttgacg gaagaagtga atactatgca gactccgtgc agggccgatt 60
caccatctcc agagacagtt ccaagaacac cctgtatctg caaatgaaca gcctg 115

<210> 60

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-4

<400> 60

actcgagacg gtgaccattg tcccttggcc ccagatatcg aaaccataat gtgctcctct 60
cgcacagtaa tacacagccg tgcctcggc tctcaggctg ttcatttg 108

<210> 61

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-S, PCR primer

<400> 61

ttcaagcttc caccatggag tttgggctga gc 32

<210> 62

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45/51

<220>

<223> 12B5VH-A, PCR primer

<400> 62

ttgggatcca ctcaccactc gagacggtga ccat 34

<210> 63

<211> 433

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (12)... (419)

<223> HEF-12B5H-g gamma. 12-419 peptide

<400> 63

aagcttcac c atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga 56

MET Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg

1

5

10

15

ggt gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cgg ccc ggg ggg 116

Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly

20

25

30

35

tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg 176

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly MET His Trp

40

45

50

55

gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga 236

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg

60

65

70

75

agt gaa tac tat gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag 296

Ser Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys

46/51

80 85 90 95
 aac acc ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 356
 Asn Thr Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110 115
 gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg 416
 Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr MET Val Thr Val Ser
 120 125 130 135
 agt ggtgagtgga tcc 433
 Ser

<210> 64

<211> 323

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (323)

<223> 12B5LV. 1-323 peptide

<400> 64

gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga gac aga gtc acc 60
 Asp Ile Gln MET Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr
 5 10 15 20
 atc acc tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc tgg tat cag cag aag cca 120
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 25 30 35 40
 ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt tta gcc agt ggg gcc cca tca 180
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser
 45 50 55 60

47/51

agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

gat gat ttt gca act tat tac tgc caa caa tat agt aat tat ccg ctc act ttc ggc gga 300

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly

85

90

95

100

ggg acc aag ctg gag atc aaa 323

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

105

<210> 65

<211> 66

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (57)

<223> reader sequence

<400> 65

atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ctc cca ggt gcc 60

MET Asp MET Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro Gly Ala

5

10

15

20

Aaa tgt 66

Lys Cys

<210> 66

<211> 110

<212> DNA

48/51

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-1

<400> 66

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
aatgtgaca tccagatgac ccagtcctct tccaccctgt ctgcatctat 110

<210> 67

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-2

<400> 67

ggagtttagg ggctttccct ggcttctgct gataccaggc caaccagtga taaataccct 60
cgctggcccg gcaggtgatg gtgactctgt ctccaataga tgcagacagg 110

<210> 68

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-3

<400> 68

aagcccctaa actcctgata tataaggcct ctagttagc cagtggggcc ccatcaagg 60
tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctaccat cagcagcctg 110

<210> 69

49/51

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-4

<400> 69

accatcagca gcctgcagcc tgatgatatt gcaacttatt actgccaaca atatagtaat 60
tatccgctca ctttcggcgg agggaccaag ctggagatca aa 102

<210> 70

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-S, PCR primer

<400> 70

ttcaagcttc caccatggac atgagggtcc cc 32

<210> 71

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-A, PCR primer

<400> 71

tctaggatcc actcacgttt gatctccagc ttggt 35

<210> 72

50/51

<211> 415

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (12)... (398)

<223> HEF-12B5H-g kappa. 12-398 peptide

<400> 72

```

aagcttcac c atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc 56
      MET Asp MET Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu
            1              5              10              15

tgg ctc cca ggt gcc aaa tgt gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca 116
Trp Leu Pro Gly Ala Lys Cys Asp Ile Gln MET Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala
            20              25              30              35

tct att gga gac aga gtc acc atc acc tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg 176
Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu
            40              45              50              55

gcc tgg tat cag cag aag cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt 236
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser
            60              65              70              75

tta gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc 296
Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
            80              85              90              95

acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgc caa caa tat agt aat 356
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn
            100             105             110             115

tat ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag ctg gag atc aaa cgtgagtggg tcctaga 415
Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

```

120

125

13.11.5

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAGI, Chiyoshi
Kojimachi Koyo Bldg.
10, Kojimachi 1-chome
Chiyoda-ku, Tokyo. 102-0083
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 25 October 2001 (25.10.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference FP1009			
International application No. PCT/JP01/03288	International filing date (day/month/year) 17 April 2001 (17.04.01)	Priority date (day/month/year) 17 April 2000 (17.04.00)	
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:
KP, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE, AG, AL, AM, AP, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 25 October 2001 (25.10.01) under No. WO 01/79494

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and the PCT Applicant's Guide, Volume II.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.91.11
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP01/03288

14. 1. 28

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAGI, Chiyoshi
Kojimachi Koyo Bldg.
10, Kojimachi 1-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 16 January 2002 (16.01.02)	
Applicant's or agent's file reference FP1009	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP01/03288	International filing date (day/month/year) 17 April 2001 (17.04.01)
International publication date (day/month/year) 25 October 2001 (25.10.01)	Priority date (day/month/year) 17 April 2000 (17.04.00)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
17 Apr 2000 (17.04.00)	2000-115246	JP	08 June 2001 (08.06.01)
20 Octo 2000 (20.10.00)	2000-321821	JP	08 June 2001 (08.06.01)
20 Octo 2000 (20.10.00)	2000-321822	JP	08 June 2001 (08.06.01)
12 Marc 2001 (12.03.01)	PCT/JP01/01912	JP	07 Janu 2002 (07.01.02)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

David MALEK

Telephone No. (41-22) 338.83.38



特 許 協 力 条 約


P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 F P 1 0 0 9	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ I P E A / 4 1 6）を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 1 / 0 3 2 8 8	国際出願日 (日.月.年) 1 7 . 0 4 . 0 1	優先日 (日.月.年) 1 7 . 0 4 . 0 0
国際特許分類 (I P C) Int. Cl ⁷ C12N15/12, C07K16/18, C12P21/08, C12N1/15, 1/19, 1/21, 5/00, A61K39/395, A61P35/00, 29/00, 7/00		
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (P C T 3 6 条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>7</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。 (P C T 規則70. 16及びP C T 実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u> </u> ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> P C T 3 5 条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input checked="" type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input checked="" type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 1 0 . 0 5 . 0 1	国際予備審査報告を作成した日 2 8 . 1 2 . 0 1	
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 本間 夏子 	4 N 9 6 3 7
電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

1. 次に關して、当該請求の範圍に記載されている發明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

- ☐ 国際出願全体
- ☒ 請求の範囲 1-19の一部, 20-22

☒ この国際出願又は請求の範囲 20-22 は、国際予備審査をすることを要しない
 次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲20-22は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT34条(4)(a)(i)及びPCT規則67.1(iv)の規定により、この国際予備審査期間が国際予備審査を行うことを要しない対象に係るものである。

- 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 1-19 の一部の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

明細書中の再構成12B5一本鎖Fvの製造に関連する、配列番号：73-84の塩基配列及びアミノ酸配列が明細書に記載されておらず、提出されたフレキシブルディスクにも記録されていない。

よって、再構成12B-5本鎖Fv及びその製造に関連する発明は、有意義な国際調査をすることができるところまで所定の要件を満たしておらず、PCT34条(4)(a)(ii)の規定により国際予備審査報告を作成しない。

- ☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 _____ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 1-19の一部、20-22 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ナクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

- ☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。
- ☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	3-5, 9, 10, 18, 19	有
	請求の範囲	1, 2, 6-8, 11-17	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-19	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-19	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

(国際調査報告で引用された文献)

文献1: WO 99/12973 A1 (Chugai Seiyaku Kabusiki Kaisha),
18. 3月.1999 (18.03.99)文献2: Mateo, V. et al., CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia.
Nature medicine (1999 Nov), Vol. 5, No. 11, pp. 1277-84文献3: Pettersen, R. D. et al., CD47 signals T cell death.
J. Immunol. (1999 Jun 15), Vol. 162, No. 12, pp. 7031-40

文献4: US, 4946778 A (Genex Corp.), 7.8月.1990 (07.08.90)

文献5: Rozsnyay, Z. et al., Phenylarsine oxide (PAO) blocks antigen receptor-induced calcium response and tyrosine phosphorylation of a distinct group proteins.
Immunology Lett. (1993 Aug), Vol. 37, No. 2-3, pp. 197-205文献6: Bazzoni, F. et al., Chemeric tumor necrosis factor receptors with constitutive signaling activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995 Jun 6), Vol. 92, No. 12, pp. 5376-80文献7: Grell, M. et al., TR60 and TR80 tumor necrosis factor (TFT)-receptors can independently mediate cytotoxicity.
lymphokine and Cytokine Research (1993), Vol. 12, No. 3, pp. 143-8文献8: O'Brien, Richard M. et al., Monoclonal antibodies for the human insulin receptor stimulate intrinsic receptor-kinase activity.
Biochem. Soc. Trans. (1986), Vol. 14, No. 6, pp. 1021-3

(補充欄に続く)

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO 00/53634 A1 [EX]	14. 09. 00	10. 03. 99	10. 03. 99

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

Ⅷ. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

1. 請求の範囲 1 の「アゴニスト作用」とは、漠然とした表現であり、不明瞭である。
2. 請求の範囲 10 には、多数の受容体が記載されているが、実施例に記載された TPO 以外の受容体について、その架橋によりアゴニスト左葉が得られることについての、裏付けが何らされていない。
3. 請求の範囲 13 に記載の「改善されたアゴニスト作用」は、その程度が一義的でなく不明瞭である。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

文献9: Yarden, Y. and Schlessinger, J., Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. biochemistry (1987), Vol. 26, No. 5, pp. 1434-42

(説明)

文献1, 2には、IAPに結合し、IAPを有する白血病細胞にアポトーシスを誘起する、Fab化、あるいはF(ab)'化した抗IAP抗体が記載されている。

請求の範囲1, 2, 6-8, 11-17に係る発明と、上記抗IAP抗体、これを産生する細胞等、及び該抗体のアゴニストとしての使用とを対比すると、両者は区別できない。

よって、請求の範囲1, 2, 6-8, 11-17に係る発明は、新規性を有さない。

文献1-3には、抗IAP (CD47) 抗体が、白血病細胞のアポトーシスを誘導することが記載されている。そして、文献1, 2煮は、抗体のFab化したもの、あるいはF(ab)'化したものでも当該活性が見られることが記載されている。

一方、タンパク質医薬分野の技術常識として、副作用等の点を考慮し、医薬活性が残存する限り、なるべく簡略化した形態のタンパク質を使用しようとするものである。そして、文献1 (第20頁第15-17行) には、一本鎖抗体をも適宜用いることが記載されており、その一般的製造方法も周知 (文献4) である。

したがって、当業者が一本鎖抗体という構成を採用してみることは、自明の事項である。

また、上記抗体 (あるいはIAPの天然のリガンドであるTSP) を相互にクロスリンク (crosslink) して使用することが、アポトーシス誘導に有利であることも、文献2の第1279頁左欄第6行-右欄第3行に記載されている。よって、上記抗体を例えばダイマーとして使用することも、当業者に自明の事項である。また、上記一本鎖抗体を発明させる宿主の選択は当業者が通常行うことである。

そして、そのことによる効果は、当業者が予測し得ないほど格別のものとも認められない。

以上より、請求の範囲1-8, 11-19に係る発明は進歩性を有さない。

文献5には、白血球の抗原受容体に特異的な抗体を用いて、抗原受容体を架橋することにより、該白血球にシグナルカスケードを引き起こしうることが記載されている。文献6, 7にはそれぞれTNF受容体について、文献8にはインスリン受容体について、さらに文献9には、上皮細胞増殖因子 (EGF) 受容体について、同様のことが記載されている。

上記架橋には抗体のH鎖V領域及びL鎖V領域が必須である点、さらにタンパク質医薬分野の技術常識として、なるべく簡略化した形態のタンパク質を使用しようとするものである点を考慮すれば、文献4に記載の方法を用いて、文献5-9に記載の受容体に対する抗体のH鎖V領域及びL鎖V領域をそれぞれ2つ以上有する一本鎖抗体のダイマーを製造し、これを用いて該受容体を架橋させ、アゴニスト活性を得ようとすることは、当業者に自明の事項である。また、上記一本鎖抗体を発言させる宿主の選択は当業者が通常行うことである。

そして、そのことによる効果は、当業者が予測し得ないほど格別のものとも認められない。

以上より、請求の範囲1-19に係る発明は進歩性を有さない。

請求項1-19に係る発明は、産業上の利用可能性を有する。

特許協力条約に基づく国際出願願書

FP1009

原本(出願用) - 印刷日時 2001年04月17日 (17.04.2001) 火曜日 11時42分54秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく 国際出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.01.2001)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許 協力条約に従って処理されるこ とを請求する。	
0-6	出願人によって指定された 受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記 号	FP1009
I	発明の名称	アゴニスト抗体
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人で ある。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	中外製薬株式会社
II-4en	Name	CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
II-5ja	あて名:	115-8543 日本国 東京都 北区 浮間 5丁目 5番 1号
II-5en	Address:	5-1, Ukima 5-chome Kita-ku, Tokyo 115-8543 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-2	右の指定国についての出願人で ある。	米国のみ (US only)
III-1-4ja	氏名 (姓名)	福島 直
III-1-4en	Name (LAST, First)	FUKUSHIMA, Naoshi
III-1-5ja	あて名:	412-8513 日本国 静岡県 御殿場市 駒門 1丁目 135番地 中外製薬株式会社内
III-1-5en	Address:	c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA 135, Komakado 1-chome Gotemba-shi, Shizuoka 412-8513 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-2-4ja III-2-4en III-2-5ja	氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:	土屋 政幸 TSUCHIYA, Masayuki 412-8513 日本国 静岡県 御殿場市 駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
III-2-5en	Address:	c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA 135, Komakado 1-chome Gotemba-shi, Shizuoka 412-8513 Japan
III-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-2-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-3-4ja III-3-4en III-3-5ja	氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:	大枝 匡義 OH-EDA, Masayoshi 412-8513 日本国 静岡県 御殿場市 駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
III-3-5en	Address:	c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA 135, Komakado 1-chome Gotemba-shi, Shizuoka 412-8513 Japan
III-3-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-3-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-4 III-4-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-4-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-4-4ja III-4-4en III-4-5ja	氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:	宇野 慎介 UNO, Shinsuke 412-8513 日本国 静岡県 御殿場市 駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
III-4-5en	Address:	c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA 135, Komakado 1-chome Gotemba-shi, Shizuoka 412-8513 Japan
III-4-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-4-7	住所 (国名)	日本国 JP



III-5 III-5-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-5-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-5-4ja	氏名 (姓名)	菊地 康文
III-5-4en	Name (LAST, First)	KIKUCHI, Yasufumi
III-5-5ja	あて名:	412-8513 日本国 静岡県 御殿場市 駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
III-5-5en	Address:	c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA 135, Komakado 1-chome Gotemba-shi, Shizuoka 412-8513 Japan
III-5-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-5-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-6 III-6-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-6-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-6-4ja	氏名 (姓名)	大友 俊彦
III-6-4en	Name (LAST, First)	OHOMO, Toshihiko
III-6-5ja	あて名:	412-8513 日本国 静岡県 御殿場市 駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
III-6-5en	Address:	c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA 135, Komakado 1-chome Gotemba-shi, Shizuoka 412-8513 Japan
III-6-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-6-7	住所 (国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、 通知のあて名 下記の者は国際機関において右 記のごとく出願人のために行動 する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名 (姓名)	高木 千嘉
IV-1-1en	Name (LAST, First)	TAKAGI, Chiyoshi
IV-1-2ja	あて名:	102-0083 日本国 東京都 千代田区 麹町一丁目10番地 麹町広洋ビル
IV-1-2en	Address:	Kojimachi Koyo Bldg. 10, Kojimachi 1-chome Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3261-2022
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3262-4453
IV-1-5	電子メール	subaru@subaru-patent.org

IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	西村 公佑; 杉本 博司
IV-2-1en	Name(s)	NISHIMURA, Tadasuke; SUGIMOTO, Hiroshi
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国で ある他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国 である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締 約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-3	国内特許(この版の EASY の配布後に特許協力条約の締 約国になった国)	CO
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先 権主張	
VI-1-1	先の出願日	2000年04月17日 (17. 04. 2000)
VI-1-2	先の出願番号	特願2000-115246
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	先の国内出願に基づく優先 権主張	
VI-2-1	先の出願日	2000年10月20日 (20. 10. 2000)
VI-2-2	先の出願番号	特願2000-321821
VI-2-3	国名	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

FP1009


原本（出願用） - 印刷日時 2001年04月17日（17. 04. 2001）火曜日 11時42分54秒

VI-3	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-3-1	先の出願日	2000年10月20日 (20. 10. 2000)	
VI-3-2	先の出願番号	特願2000-321822	
VI-3-3	国名	日本国 JP	
VI-4	先の国際出願に基づく優先権主張		
VI-4-1	先の出願日	2001年03月12日 (12. 03. 2001)	
VI-4-2	先の出願番号	PCT/JP01/01912	
VI-4-3	受理官庁名	日本国 JP	
VI-5	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1, VI-2, VI-3, VI-4	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	6	-
VIII-2	明細書（配列表を除く）	67	-
VIII-3	請求の範囲	3	-
VIII-4	要約	1	fp1009要約書.txt
VIII-5	図面	43	-
VIII-6	明細書の配列表	51	-
VIII-7	合計	171	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるマルチメディア及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディスク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面	-
VIII-17	その他	陳述書	-
VIII-17	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号		
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名 (姓名)	高木 千嘉 	
IX-2	提出者の記名押印		
IX-2-1	氏名 (姓名)	西村 公佑 	

特許協力条約に基づく国際出願願書

FP1009

原本（出願用） - 印刷日時 2001年04月17日（17. 04. 2001）火曜日 11時42分54秒

IX-3	提出者の記名押印	
IX-3-1	氏名(姓名)	杉本 博司 

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

FP1009

原本(出願用) - 印刷日時 2001年04月17日 (17.04.2001) 火曜日 11時42分54秒

[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄		
0-1	国際出願番号.		
0-2	受理官庁の日付印		
0-4	様式-PCT/RO/101 (付属書)		
0-4-1	このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。		PCT-EASY Version 2.91 (updated 01.01.2001)
0-9	出願人又は代理人の書類記号		FP1009
2	出願人		中外製薬株式会社
12	所定の手数料の計算		金額/係数 小計 (JPY)
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000
12-2	調査手数料 S	⇒	72,000
12-3	国際手数料 基本手数料 (最初の30枚まで) b1	46,200	
12-4	30枚を越える用紙の枚数	141	
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,100	
12-6	合計の手数料 b2	155,100	
12-7	b1 + b2 = B	201,300	
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国 数	88	
12-9	Number of designation fees payable (maximum 6)	6	
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	10,000	
12-11	合計の指定手数料 D	60,000	
12-12	PCT-EASYによる料金の 減額 R	-14,000	
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	247,300
12-14	優先権証明書請求手数料 優先権証明書を請求した数	4	
12-15	1優先権証明書当たり (X) の手数料	1,400	
12-16	優先権証明書請求手数料 の合計 P	⇒	5,600
12-17	納付すべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	342,900
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 銀行口座への振込み 優先権証明書請求手数料: 特許印紙	

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-1-1	出願人による言及 注釈	9173 弁理士 高木 千嘉 8053 弁理士 西村 公佑 11059 弁理士 杉本 博司
13-2-2	EASYによるチェック結果 指定国	Yellow! “追加する指定国”の欄を用いた指定がなされていますが、この欄を用いることなく、更新された最新のメンテナンステーブルを入手し使用することを推奨します。
13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Green? 出願人 1: 電話番号が記入されていません。
		Green? 出願人 1: ファクシミリ番号が記入されていません。
13-2-6	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 要約書とともに提示する図の番号が示されていません。
13-2-7	EASYによるチェック結果 手数料	Green? 修正された手数料の金額が正しいか確認してください。
13-2-9	EASYによるチェック結果 注釈	Green? 願書に表示しなければならない通常の項目はすべて他のPCT-EASYの機能で入力することができます。言及を用いた表示の有効性について確認してください。
13-2-10	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Naoshi FUKUSHIMA et al.

Title: AGONIST ANTIBODIES

Appl. No.: PCT/JP01/03288

Filing Date: April 17, 2001

Examiner: Not Yet Assigned

Art Unit: Not Yet Assigned

**STATEMENT TO SUPPORT FILING AND SUBMISSION IN
ACCORDANCE WITH 37 C.F.R. §§ 1.821-1.825**

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231
Box SEQUENCE

Sir:

In connection with a Sequence Listing submitted concurrently herewith, the undersigned hereby states that:

1. the submission, filed herewith in accordance with 37 C.F.R. § 1.821(g), does not include new matter; and

2. the content of the attached paper copy and the attached computer readable copy of the Sequence Listing, submitted in accordance with 37 C.F.R. § 1.821(c) and (e), respectively, are the same.

Please direct all correspondence to the undersigned attorney or agent at the address indicated below.

Respectfully submitted,

Date January 24, 2003

By Eve L. Frank

FOLEY & LARDNER
Customer Number: 22428

Eve L. Frank
Registration No. 46,785



22428

PATENT TRADEMARK OFFICE

Telephone: (202) 945-6142

Facsimile: (202) 672-5399

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Agonist antibody

<130> FP1009

<141> 2001-04-17

<150> JP2000-115246

<151> 2000-04-17

<150> JP2000-321821

<151> 2000-10-20

<150> JP2000-321822

<151> 2000-10-20

<150> PCT/JP01/01912

<151> 2001-03-12

<160> 84

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

ccatcctaatacgaactcactatagggc 27

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

ggatcccggg tggatgggtg gaagatg 27

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

ggatcccggg ccagtggata gacagatg 28

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

ggatcccggg agtggataga ccgatg 26

<210> 5

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(393)

<223> pGEM-M1L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 5

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

5

10

15

gcg tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 90

Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu

20

25

30

cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 135

Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

35

40

45

cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 180

Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr

50

55

60

cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 225

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

65

70

75

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

80

85

90

tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 315

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

95

100

105

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

110

115

120

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

125

130

<210> 6

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(408)

<223> pGEM-M1H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 6

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45

Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala

5

10

15

ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

10

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
 65 70 75
 ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270
 Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 80 85 90
 tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315
 Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 95 100 105
 gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 110 115 120
 tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 tca g 409
 Ser

<210> 7

<211> 394

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(393)

<223> pGEM-M2L. 1-57;signal peptide, 58-394;mature peptide

<400> 7

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct 45
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro

5	10	15	
ggt tcc agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 90			
Gly Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu			
20	25	30	
cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 135			
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser			
35	40	45	
cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 180			
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr			
50	55	60	
ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 225			
Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val			
65	70	75	
tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 270			
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly			
80	85	90	
tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 315			
Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu			
95	100	105	
gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 360			
Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr			
110	115	120	
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa c 394			
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
125	130		

<210> 8

<211> 409

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(408)

<223> pGEM-M2H. 1-57;signal peptide, 58-409;mature peptide

<400> 8

```

atg gaa tgg agc tgg ata ttt ctc ttc ctc ctg tca gga act gca 45
Met Glu Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala
      5              10              15

ggt gtc cac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90
Gly Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
      20              25              30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
      35              40              45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180
Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro
      50              55              60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
      65              70              75

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270
Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
      80              85              90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315
Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu
      95              100             105

```

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360

Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr

110

115

120

tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405

Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser

125

130

135

tca g 409

Ser

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 9

cccaagcttc caccatgaag ttgcctgtta gg 32

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 10

cccaagcttc caccatggaa tggagctgga ta 32

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

cgcggtacca ctcacgtttt attccagct tggt 34

<210> 12

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

cgcggtacca ctcacctgag gagactgtga gagt 34

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

catgccatgg cgcaggtcca gctgcagcag 30

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

accaccacct gaggagactg tgagagt 27

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

gtctcctcag gtggtggtgg ttcgggt 27

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 16

cacaacatcc gatccgccac caccoga 27

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 17

ggcggatcgg atgttgtgat gacccaa 27

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 18

ccggaattct cattatttat cgtcatcgtc ttgtagtct ttattttcca gcttggt 57

<210> 19

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker amino acid sequence and nucleotide sequence

<400> 19

ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

5

10

15

<210> 20

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(826)

<223> pscM1. MABL1-scFv

<400> 20

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5

10

15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20

25

30

cct gac ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35

40

45

gct tct gga tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys

50

55

60

cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225

Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro

65

70

75

tac aat gat ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc 270

Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala

80

85

90

aca ctg act tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc 315

Thr Leu Thr Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu

95

100

105

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga 360
 Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 110 115 120
 ggg ggt tac tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405
 Gly Gly Tyr Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 125 130 135
 aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt 450
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 140 145 150
 ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg 495
 Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu
 155 160 165
 cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt 540
 Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 170 175 180
 cag agc ctt cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac 585
 Gln Ser Leu Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr
 185 190 195
 cta cag aag cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt 630
 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val
 200 205 210
 tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675
 Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 215 220 225
 tca ggg aca gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag 720
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 230 235 240
 gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

245

250

255

acg tcc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

260

265

270

gat gac gat aaa taa tga 828

Asp Asp Asp Lys

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

acgcgtcgac tcccaggtcc agctgcagca g 31

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

gaaggtgtat ccagaagc 18

<210> 23

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(813)

<223> pCHOM1. MABL1-scFv

<400> 23

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr

5

10

15

ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gac ctg 90

Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu

20

25

30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135

Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

tac acc ttc gtt aac cat gtt atg cac tgg gtg aag cag aag cca 180

Tyr Thr Phe Val Asn His Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro

50

55

60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225

Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

65

70

75

ggt act aag tac aat gag aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act 270

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr

80

85

90

tca gag aaa tcc tcc agc gca gcc tac atg gag ctc agc agc ctg 315

Ser Glu Lys Ser Ser Ser Ala Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

95

100

105

gcc tct gag gac tct gcg gtc tac tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 110 115 120
 tat agt tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Ser Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 140 145 150
 tcg gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495
 Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 155 160 165
 ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc ctt 540
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 170 175 180
 cta cac agt aaa gga aac acc tat tta caa tgg tac cta cag aag 585
 Leu His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys
 185 190 195
 cca ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 200 205 210
 TTT TCT GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA 675
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 215 220 225
 gat ttc aca ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
 Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 230 235 240
 gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg tcc gga 765

Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Ser Gly

245

250

255

ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810

Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

260

265

270

aaa taa tga 819

Lys

<210> 24

<211> 828

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(822)

<223> pscM2. MABL2-scFv

<400> 24

atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc 45

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu

5

10

15

gct gcc caa cca gcc atg gcg cag gtc cag ctg cag cag tct gga 90

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly

20

25

30

cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag 135

Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys

35

40

45

gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag 180

Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys

50	55	60
cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct 225		
Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro		
65	70	75
tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc 270		
Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala		
80	85	90
act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 315		
Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu		
95	100	105
agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga 360		
Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg		
110	115	120
ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc 405		
Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu		
125	130	135
aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt 450		
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
140	145	150
ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg 495		
Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu		
155	160	165
cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt 540		
Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser		
170	175	180
cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac 585		
Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr		
185	190	195

ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt 630

Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val

200

205

210

tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga 675

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly

215

220

225

tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag 720

Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu

230

235

240

gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac 765

Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr

245

250

255

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac 810

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp

260

265

270

gat gac gat aaa taa tga 828

Asp Asp Asp Lys

<210> 25

<211> 819

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(813)

<223> pCHOM2. MABL2-scFv

<400> 25

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr			
	5	10	15
ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg			90
Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu			
	20	25	30
gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga			135
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly			
	35	40	45
tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca			180
Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro			
	50	55	60
ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat			225
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp			
	65	70	75
ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act			270
Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr			
	80	85	90
tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg			315
Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu			
	95	100	105
gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac			360
Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr			
	110	115	120
tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc			405
Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser			
	125	130	135
tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga			450
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			

140	145	150
tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495		
Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser		
155	160	165
ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt 540		
Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu		
170	175	180
gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag 585		
Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys		
185	190	195
cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630		
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg		
200	205	210
ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca 675		
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr		
215	220	225
gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720		
Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly		
230	235	240
gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga 765		
Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly		
245	250	255
ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 810		
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp		
260	265	270
aaa taa tga 819		
Lys		

<210> 26

<211> 456

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(450)

<223> pCHO-shIAP. Soluble human IAP

<400> 26

atg tgg ccc ctg gta gcg gcg ctg ttg ctg ggc tcg gcg tgc tgc 45

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys

5

10

15

gga tca gct cag cta cta ttt aat aaa aca aaa tct gta gaa ttc 90

Gly Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe

20

25

30

acg ttt tgt aat gac act gtc gtc att cca tgc ttt gtt act aat 135

Thr Phe Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn

35

40

45

atg gag gca caa aac act act gaa gta tac gta aag tgg aaa ttt 180

Met Glu Ala Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe

50

55

60

aaa gga aga gat att tac acc ttt gat gga gct cta aac aag tcc 225

Lys Gly Arg Asp Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser

65

70

75

act gtc ccc act gac ttt agt agt gca aaa att gaa gtc tca caa 270

Thr Val Pro Thr Asp Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln

80

85

90

tta cta aaa gga gat gcc tct ttg aag atg gat aag agt gat gct 315

Leu Leu Lys Gly Asp Ala Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala
 95 100 105
 gtc tca cac aca gga aac tac act tgt gaa gta aca gaa tta acc 360
 Val Ser His Thr Gly Asn Tyr Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr
 110 115 120
 aga gaa ggt gaa acg atc atc gag cta aaa tat cgt gtt gtt tca 405
 Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser
 125 130 135
 tgg ttt tct cca aat gaa aat gac tac aag gac gac gat gac aag 450
 Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 140 145 150
 tga tag 456

<210> 27

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 27

ggaattccat atgcaagtgc aacttcaaca gtctggacct gaactg 46

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 28

ggaattctca ttattttatt tccagcttgg t 31

<210> 29

<211> 741

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(735)

<223> pscM2DEm02. MABL2-scFv

<400> 29

atg caa gtg caa ctt caa cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct 45

Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro

5 10 15

ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc 90

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

20 25 30

gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc 135

Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly

35 40 45

ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat ggt act aag 180

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys

50 55 60

tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa 225

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys

65 70 75

tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag 270

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu
 80 85 90
 gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac 315
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr
 95 100 105
 gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt 360
 Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly
 110 115 120
 ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggc gga tcg gat gtt 405
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val
 125 130 135
 gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 450
 Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp
 140 145 150
 caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 495
 Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 155 160 165
 aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag 540
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 170 175 180
 tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg 585
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
 185 190 195
 gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca 630
 Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr
 200 205 210
 ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc 675
 Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe

215	220	225	
tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc 720			
Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr			
230	235	240	
aag ctg gaa ata aaa taa tga 741			
Lys Leu Glu Ile Lys			

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 30

cagacagtgg ttcaaagt 18

<210> 31

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 31

cgcgtcgacc gatccgccac caccgaacc accaccaccc gaaccaccac caccttttat 60

ttccagcttg gt

72

<210> 32

<211> 1605

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1599)

<223> pCHOM2(Fv)2. MABL2-sc(Fv)2

<400> 32

```

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca 45
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
      5              10              15

ggt gtc gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg 90
Gly Val Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu
      20              25              30

gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga 135
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
      35              40              45

tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca 180
Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro
      50              55              60

ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 225
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp
      65              70              75

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act 270
Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr
      80              85              90

tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg 315
Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu
      95              100             105

```

gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac 360
 Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr
 110 115 120
 tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc 405
 Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser
 125 130 135
 tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga 450
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 140 145 150
 tcg gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt 495
 Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser
 155 160 165
 ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt 540
 Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 170 175 180
 gtg cac agt aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag 585
 Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 185 190 195
 cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga 630
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 200 205 210
 ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca gtg aca 675
 Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr
 215 220 225
 gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga 720
 Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
 230 235 240
 gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg ttc gga 765

Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly			
245	250	255	
ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa ggt ggt ggt ggt tgc ggt ggt	810		
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
260	265	270	
ggt ggt tgc ggt ggt ggc gga tgc gtc gac tcc cag gtc cag ctg	855		
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Val Asp Ser Gln Val Gln Leu			
275	280	285	
cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag	900		
Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys			
290	295	300	
atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att	945		
Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile			
305	310	315	
cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga	990		
His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly			
320	325	330	
tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc	1035		
Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe			
335	340	345	
aag gac aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc	1080		
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala			
350	355	360	
tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat	1125		
Tyr Met Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr			
365	370	375	
tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg ggc caa	1170		
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln			

380	385	390
ggc acc act ctc aca gtc tcc tca ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt 1215		
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly		
395	400	405
ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gat gtt gtg atg acc caa agt 1260		
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser		
410	415	420
cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct 1305		
Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser		
425	430	435
tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga aag acc tat 1350		
Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr		
440	445	450
tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc ctg 1395		
Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu		
455	460	465
atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc 1440		
Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe		
470	475	480
agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga 1485		
Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu Met Ile Ser Arg		
485	490	495
gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca 1530		
Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr		
500	505	510
cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 1575		
His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
515	520	525

gac tac aaa gac gat gac gat aaa taa tga 1605

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

530

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 33

tgaggaattc ccaccatggg atg 33

<210> 34

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 34

cacgacgtca ctcgagactg tgagagtggg gccttgccc 40

<210> 35

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 35

agtctcgagt gacgtcgtga tgacccaaag tccactctcc 40

<210> 36

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 36

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt c 31

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 37

cgcgtaatac gactcactat ag 22

<210> 38

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 38

gcaattggac ctgttttatc tcgagcttgg tccccctcc gaacgt 46

<210> 39

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 39

gctcgagata aaacaggtcc aattgcagca gtctggacct gaact 45

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 40

gactggatcc tcattattta tcgtcatcgt cttttagtc tgaggagact gtgagagtgg 60

<210> 41

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 41

gactgaattc ccaccatgaa gttgcctgtt ag 32

<210> 42

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 42

cagtctcgag tgggtggtcc gacgtcgtga tgacccaaag 40

<210> 43

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

cagtctcgag tgggtggtggt tccgacgtcg tgatgacca aag 43

<210> 44

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 44

cagtctcgag tgggtggtggt ggttccgacg tcgtgatgac ccaaag 46

<210> 45

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 45

cagtctcgag tggtagtggt gtaggttcg acgtcgtgat gacccaaag 49

<210> 46

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 46

cagtctcgag tggtagtggt gtaggtggtt ccgacgtcgt gatgacccaa ag 52

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 47

ggccgcatgt tgtcacgaat 20

<210> 48

<211> 780

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(768)

<223> CF2HL-0/pCOS1. MABL2-scFv<HL-0>

<400> 48

atg gga tgg agc tgt atc atc ctc ttc ttg gta gca aca gct aca ggt gtc 51

MET Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val

5

10

15

gac tcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg 102

Asp Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly

20

25

30

gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat 153

Ala Ser Val Lys MET Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His

35

40

45

50

gtt att cac tgg gtg aag cag aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga 204

Val Ile His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

55

60

65

tat att tat cct tac aat gat ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac 255

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp

70

75

80

85

aag gcc act ctg act tca gac aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc 306

Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu

90

95

100

agc agc ctg gcc tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt 357

Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly

105	110	115	
tac tat act tac gac gac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcg agt 408			
Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
120	125	130	135
gac gtc gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt gga gat 459			
Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp			
140	145	150	
caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt aat gga 510			
Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly			
155	160	165	170
aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca aaa ctc 561			
Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu			
175	180	185	
ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg ttc agt 612			
Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
190	195	200	
ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg gag gct 663			
Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val Glu Ala			
205	210	215	220
gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg tac acg 714			
Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr			
225	230	235	
ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa gac tac aaa gac gat gac gat 765			
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp			
240	245	250	255
aaa taa tga gga tcc 780			
Lys			

<210> 49

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 49

caagctcgag ataaaatccg gaggccaggt ccaattgcag cagtc 45

<210> 50

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 50

caagctcgag ataaaatccg gaggtggcca ggtccaattg cagcagtc 48

<210> 51

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 51

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg ccaggtccaa ttgcagcagt c 51

<210> 52

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 52

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggccaggtc caattgcagc agtc 54

<210> 53

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 53

caagctcgag ataaaatccg gaggtggtgg tggggccag gtccaattgc agcagtc 57

<210> 54

<211> 780

<212> DNA

<213> Mus

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(768)

<223> CF2LH-0/pCOS1. MABL2-scFv<LH-0>

<400> 54

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct ggt tcc 51

MET Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu MET Phe Trp Ile Pro Gly Ser

5	10	15	
agc agt gat gtt gtg atg acc caa agt cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102			
Ser Ser Asp Val Val MET Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu			
20	25	30	
gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tca agt cag agc ctt gtg cac agt 153			
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser			
35	40	45	50
aat gga aag acc tat tta cat tgg tac ctg cag aag cca ggc cag tct cca 204			
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro			
55	60	65	
aaa ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca gac agg 255			
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg			
70	75	80	85
ttc agt ggc agt gga tca gtg aca gat ttc aca ctc atg atc agc aga gtg 306			
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Leu MET Ile Ser Arg Val			
90	95	100	
gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc tct caa agt aca cat gtt ccg 357			
Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His Val Pro			
105	110	115	
tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctc gag ata aaa cag gtc caa ttg cag 408			
Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln Val Gln Leu Gln			
120	125	130	135
cag tct gga cct gaa ctg gta aag cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc 459			
Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys MET Ser Cys			
140	145	150	
aag gct tct gga tac acc ttc gct aac cat gtt att cac tgg gtg aag cag 510			
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ala Asn His Val Ile His Trp Val Lys Gln			
155	160	165	170

aag cca ggg cag ggc ctt gag tgg att gga tat att tat cct tac aat gat 561

Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Asp

175

180

185

ggt act aag tat aat gag aag ttc aag gac aag gcc act ctg act tca gac 612

Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp

190

195

200

aaa tcc tcc acc aca gcc tac atg gac ctc agc agc ctg gcc tct gag gac 663

Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr MET Asp Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp

205

210

215

220

tct gcg gtc tat tac tgt gca aga ggg ggt tac tat act tac gac gac tgg 714

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Trp

225

230

235

ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca gac tac aaa gac gat gac gat 765

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

240

245

250

255

aaa taa tga gga tcc 780

Lys

<210> 55

<211> 351

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(351)

<223> 12B5HV. 1-351 peptide

<400> 55

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cgg ccc ggg ggg tcc ctg agt ctc 60

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu
 5 10 15 20
 tcc tgt gca gtc tct gga atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct 120
 Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly MET His Trp Val Arg Gln Ala
 25 30 35 40
 cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga agt gaa tac tat 180
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg Ser Glu Tyr Tyr
 45 50 55 60
 gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag aac acc ctg tat 240
 Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gga gca 300
 Leu Gln MET Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala
 85 90 95 100
 cat tat ggt ttc gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg agt 351
 His Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr MET Val Thr Val Ser Ser
 105 110 115

<210> 56

<211> 57

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(57)

<223> reader sequence

<400> 56

atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt gtc cag tgt 57

MET Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly Val Gln Cys

5

10

15

<210> 57

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-1

<400> 57

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtccggcccg gggggtcctt gagtc 115

<210> 58

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-2

<400> 58

aaggatatac ctgccacca ctccagcccc ttgcctggag cctggcggac ccagtgcattg 60
ccgtaggtcc tgagggtgat tccagagact gcacaggaga gactcaggga ccccc 115

<210> 59

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-3

<400> 59

ggcaggtata tcctttgacg gaagaagtga atactatgca gactccgtgc agggccgatt 60
caccatctcc agagacagtt ccaagaacac cctgtatctg caaatgaaca gcctg 115

<210> 60

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-4

<400> 60

actcgagacg gtgaccattg tcccttggcc ccagatatcg aaaccataat gtgctcctct 60
cgcacagtaa tacacagccg tgcctcggc tctcaggctg ttcatttg 108

<210> 61

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-S, PCR primer

<400> 61

ttcaagcttc caccatggag tttgggctga gc 32

<210> 62

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VH-A, PCR primer

<400> 62

ttgggatcca ctcaccactc gagacggtga ccat 34

<210> 63

<211> 588

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (236)...(558)

<223> 1-235;intron, 236-558;Human IgG constant region (partial)

<400> 63

gaattcgtga gtggatccca agctagcttt ctggggcagg ccaggcctga ccttggcttt 60
 ggggcaggga gggggctaag gtgaggcagg tggcgccagc caggcgcac acccaatgccc 120
 atgagcccag aactggacg ctgaacctcg cggacagtta agaaccagg ggcctctgcg 180
 ccctgggccc agctctgtcc cacaccgagg tcacatggca caacctctct tgca gcc tcc 240

Ala Ser

1

acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca 300
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr

5

10

15

20

gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac 360
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

25

30

35

40

tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc 420
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu

45 50 55 60
 tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc 480
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 65 70 75 80
 tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct 540
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 85 90 95 100
 tgt gac aaa act cac aca 558
 Cys Asp Lys Thr His Thr

105

<210> 64

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G1CH1-S, PCR primer

<400> 64

tgagaattcg tgagtggatc ccaagct 27

<210> 65

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> G1CH1-A, PCR primer

<400> 65

aaaagatctt tatcatgtgt gagttttgtc acaagatttg ggctcaactt tcttgtccac 60

<210> 66

<211> 433

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (12)...(419)

<223> HEF-12B5H-g gamma. 12-419 peptide

<400> 66

aagcttcac c atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga 56

MET Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg

1

5

10

15

ggt gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cgg ccc ggg ggg 116

Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly

20

25

30

35

tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg 176

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly MET His Trp

40

45

50

55

gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga 236

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg

60

65

70

75

agt gaa tac tat gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag 296

Ser Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys

80

85

90

95

aac acc ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 356

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

100

105

110

115

gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg 416

Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr MET Val Thr Val Ser
 120 125 130 135

agt ggtgagtgga tcc 433

Ser

<210> 67

<211> 323

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(323)

<223> 12B5LV. 1-323 peptide

<400> 67

gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga gac aga gtc acc 60
 Asp Ile Gln MET Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr
 5 10 15 20
 atc acc tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc tgg tat cag cag aag cca 120
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 25 30 35 40
 ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt tta gcc agt ggg gcc cca tca 180
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser
 45 50 55 60
 agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gat gat ttt gca act tat tac tgc caa caa tat agt aat tat ccg ctc act ttc ggc gga 300
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly

85 90 95 100

ggg acc aag ctg gag atc aaa 323

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

105

<210> 68

<211> 66

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(66)

<223> reader sequence

<400> 68

atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg ctc cca ggt gcc 60

MET Asp MET Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro Gly Ala

5

10

15

20

Aaa tgt 66

Lys Cys

<210> 69

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-1

<400> 69

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct ccaggtgcc 60

aaatgtgaca tccagatgac ccagtctcct tccaccctgt ctgcatctat 110

<210> 70

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-2

<400> 70

ggagtttagg ggctttccct ggcttctgct gataccaggc caaccagtga taaataccct 60
cgctggcccg gcaggatgatg gtgactctgt ctccaataga tgcagacagg 110

<210> 71

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-3

<400> 71

aagcccctaa actcctgata tataaggcct ctagtttagc cagtggggcc ccatcaaggt 60
tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctaccat cagcagcctg 110

<210> 72

<211> 103

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-4

<400> 72

tttgatctcc agcttgggcc ctccgccgaa agtgagcgga taattactat attgttgcca 60
gtaataagtt gcaaaatcat caggctgcag gctgctgatg gtg 103

<210> 73

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-S, PCR primer

<400> 73

ttcaagcttc caccatggac atgagggtcc cc 32

<210> 74

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5VL-A, PCR primer

<400> 74

tctaggatcc actcacgttt gatctccagc ttggt 35

<210> 75

<211> 415

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (12)...(398)

<223> HEF-12B5H-g kappa. 12-398 peptide

<400> 75

aagcttccac c atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc 56

MET Asp MET Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

tgg ctc cca ggt gcc aaa tgt gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca 116

Trp Leu Pro Gly Ala Lys Cys Asp Ile Gln MET Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala

20 25 30 35

tct att gga gac aga gtc acc atc acc tgc cgg gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg 176

Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu

40 45 50 55

gcc tgg tat cag cag aag cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt 236

Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser

60 65 70 75

tta gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc 296

Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

80 85 90 95

acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgc caa caa tat agt aat 356

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn

100 105 110 115

tat ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag ctg gag atc aaa cgtgagtgga tcctaga 415

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

120 125

<210> 76

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FLAG tag sequence

<400> 76

gac tac aag gat gac gac gat aag 24

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

5

<210> 77

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5-S, PCR primer

<400> 77

atagaattcc accatggagt ttgggctgag c 31

<210> 78

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HuVHJ3, PCR primer

<400> 78

tgaagagacg gtgaccattg tccc 24

<210> 79

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RhuJH3, PCR primer

<400> 79

ggacaatggt caccgtctct tcaggtgg 28

<210> 80

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> RhuVK1, PCR primer

<400> 80

ggagactggg tcacttgat gtccgatccg cc 32

<210> 81

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HuVK1.2, PCR primer

<400> 81

gacatccaga tgaccagtc tcc 23

<210> 82

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 12B5F-A, PCR primer

<400> 82

attgcggccg cttatcactt atcgctgtca tcctttagt ctttgatctc cagcttggt 59

<210> 83

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker amino acid sequence and nucleotide sequence

<400> 83

ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg 45

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

5

10

15

<210> 84

<211> 823

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> (12)...(809)

<223> pCOS-sc12B5. sc12B5

<400> 84

aagcttcac c atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga 56

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg

1	5	10	15
ggt gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ttg gtc cgg ccc ggg ggg 116			
Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly			
20	25	30	35
tcc ctg agt ctc tcc tgt gca gtc tct gga atc acc ctc agg acc tac ggc atg cac tgg 176			
Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Thr Leu Arg Thr Tyr Gly MET His Trp			
40	45	50	55
gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca ggt ata tcc ttt gac gga aga 236			
Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gly Ile Ser Phe Asp Gly Arg			
60	65	70	75
agt gaa tac tat gca gac tcc gtg cag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac agt tcc aag 296			
Ser Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ser Lys			
80	85	90	95
aac acc ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 356			
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
100	105	110	115
gcg aga gga gca cat tat ggt ttc gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc acc gtc tcg 416			
Ala Arg Gly Ala His Tyr Gly Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr MET Val Thr Val Ser			
120	125	130	135
agt ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggt ggt tcg ggt ggt ggc gga tcg gac atc cag atg 476			
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met			
140	145	150	155
acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct att gga gac aga gtc acc atc acc tgc cgg 536			
Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg			
160	165	170	175
gcc agc gag ggt att tat cac tgg ttg gcc tgg tat cag cag aag cca ggg aaa gcc cct 596			
Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
180	185	190	195

aaa ctc ctg atc tat aag gcc tct agt tta gcc agt ggg gcc cca tca agg ttc agc ggc 656

Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly

200

205

210

215

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct gat gat ttt gca 716

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala

220

225

230

235

act tat tac tgc caa caa tat agt aat tat ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag ctg 776

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

240

245

250

255

gag atc aaa gac tac aag gat gac gac gat aag tga taa gcggccgc 823

Glu Ile Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

260

265